

**„Klinische Langzeitergebnisse und
experimentelle Untersuchungen zur
Stimulierbarkeit des Ein- und Umbauverhalten
einer autologen vorderen Kreuzbandplastik“**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Orthopädie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt – Universität zu Berlin

von

Dr. med. Karsten Labs
geboren am 17.09.1964 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Lobenhoffer, Hannover
2. Prof. Plitz, München

eingereicht am: 21.12.2001

Meiner Mutter
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Standortbestimmung zur vorderen Kreuzbandchirurgie	6
1.2 Einwachsverhalten von Kreuzbandplastiken	7
2. Klinische Untersuchung	10
2.1 Literaturüberblick von Langzeituntersuchungen nach vorderer Kreuzbandchirurgie.....	10
2.2 Fragestellung	14
2.3 Material und Methoden	14
2.3.1 Patientendaten	16
2.3.2 Operationstechnik	16
2.3.3 Nachbehandlung	17
2.3.4 Evaluierung	17
2.4 Statistik	24
2.5 Klinische Resultate	25
2.6 Diskussion der klinischen Resultate	38
2.7 Zusammenfassung	46
2.8 Klinische Schlussfolgerungen.....	47
3. Wissenschaftliche Fragestellung.....	48
4. Experimentelle Grundlagen.....	49
4.1 Mikrostrukturierung des Sehnen- und Bandapparates	49
4.2 Biochemische Charakteristik des Sehnen- und Bandapparates.....	50
4.3 Fibrinstabilisierender Faktor XIII	53
4.3.1 Biochemische Charakteristika	53
4.3.2 Funktion und Wirkung	55
4.3.3 Gewinnung und Herstellung von Faktor XIII Konzentraten	57
4.3.4 Labordiagnostik des Faktor XIII	58
4.3.5 Tierexperimentell chirurgische Anwendung.....	59
4.3.6 Klinisch chirurgische Anwendung.....	60
5. Zielsetzung.....	62
6. Material und Methoden	63
6.1 Geräte und Chemikalien.....	63
6.2 Tierexperimenteller Versuchsaufbau	65

6.2.1	Versuchsgruppen	65
6.2.2	Randomisierung der Versuchstiere	66
6.3	Operationsmethoden	67
6.3.1	Nachuntersuchungsintervalle	70
6.3.2	Explantation.....	70
6.4	Faktor XIII – Kontrolle.....	70
6.5	Makroskopische Befunddokumentation.....	71
6.6	Knorpelstatus und Osteoarthrosedokumentation	71
6.7	Ausrissfestigkeitsuntersuchungen	72
6.8	Histologische und histomorphometrische Untersuchungen.....	74
6.8.1	Übersichtslichtmikroskopie.....	74
6.8.2	Histomorphometrie	74
6.9	Kollagenfibrillenmorphometrie	76
6.10	Biochemische Analyse	77
6.10.1	Quantitative Hydroxyprolinbestimmung	77
6.10.2	Analyse der nichtreduzierbaren Quervernetzungen	79
6.10.3	Quantitative Kollagen-Typ I und III Bestimmung.....	80
6.11	Statistische Auswertung.....	84
7.	Experimentelle Ergebnisse	85
7.1	Faktor XIII-Analyse	85
7.2	Makroskopische Befunde	86
7.3	Radiologische und histologische Osteoarthrose.....	88
7.4	Histologie und Histomorphometrie.....	92
7.5	Kollagenfibrillenmorphometrie	106
7.6	Gesamtkollagengehalt.....	111
7.7	Pyridinolin und Deoxypyridinolin.....	112
7.8	Kollagentypisierung	116
7.9	Ausrissfestigkeitsuntersuchungen	122
7.10	Korrelationsanalyse	127
8.	Diskussion der experimentellen Ergebnisse	128
8.1	Tiermodell, Operationstechnik und Komplikationen	128
8.2	Wirkung der Faktor XIII-Applikation.....	130
8.3	Makroskopische Befunde und Osteoarthrose.....	132
8.4	Morphologische und ultrastrukturelle Ergebnisse.....	133
8.5	Biochemische Ergebnisse	140
8.6	Biomechanische Ergebnisse	149

8.7 Zusammenfassende Diskussion	151
9. Zusammenfassung und Perspektiven	153
10. Literaturverzeichnis	157
11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	189
12. Danksagung	190
13. Anhang	192
13. 1 Abkürzungsverzeichnis	192
13. 3 Tierversuchgenehmigung	194

1. Einleitung

1.1 Standortbestimmung zur vorderen Kreuzbandchirurgie

Der Erfolg einer plastischen Versorgung des vorderen Kreuzbandes wird maßgeblich vom Operationszeitpunkt, der chirurgischen Methode und Technik, dem Transplantat, dem Transplantatumbau und der Rehabilitation bestimmt.

Grundlegende Erkenntnisse über die bedeutende Funktion der Kreuzbänder als Zentralpfeiler im System Arthron und deren Einfluss auf die Dynamik und Kinematik während der Roll-Gleit-Bewegung sind das Ergebnis umfangreicher Forschungsarbeiten in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts (MENSCHIK 1974, 1975). Die morphologischen Veränderungen im zeitlichen Ablauf vom Transplantationszeitpunkt bis zur Ausreifung einer autologen Plastik sind ein weniger bekanntes Kapitel der Kreuzbandchirurgie.

Vergleichende Studien zwischen nichtoperativer und operativer Therapie hinsichtlich der Kniegelenkstabilität, sekundären Meniskusschäden und der Arthroseentwicklung zeigten die eindeutige Überlegenheit der frühsekundären plastischen Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes (DIEKSTALL und RAUHUT 1999, SCAVENIUS et al. 1999, SEITZ et al. 1994, WITTENBERG et al. 1998, ZYSK und REFIOR 2000).

Obwohl die Patellarsehnen-Plastik als Kreuzbandersatz die häufigste Anwendung findet, weisen experimentelle Daten darauf hin, dass autologe Plastiken nach einer umfangreichen Einheilungs- und Adaptationsphase nicht die adäquaten biomechanischen Eigenschaften (CLANCY et al. 1981, JACKSON et al. 1987, McFARLAND et al. 1986) des unverletzten Kreuzbandes erreichen. Hieraus postoperative Kniegelenkinstabilitäten, meniskale und kartilaginäre Sekundärschäden, Instabilitätsarthrosen sowie zahlreiche Revisionseingriffe resultieren (GILLQUIST und MESSNER 1999, JOMHA et al. 1999b, MITSOU und VALLIANATOS 1996, EBERHARDT et al. 2000).

Die Vielfalt der angewandten operativen Techniken und eingesetzten Transplantate ist Ausdruck dafür, dass der goldene Standard in der vorderen Kreuzbandchirurgie derzeit noch nicht gefunden ist.

Ziel gegenwärtiger experimenteller wissenschaftlicher Arbeiten ist es, den Verlauf der Kinetik des Transplantatumbaus zu beschleunigen und die biomechanischen Eigenschaften der rekonstruierten Transplantate zu verbessern. Hierfür rücken transplantatstimulierende Einflussfaktoren, wie Wachstumsfaktoren und Gentherapie immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

1.2 Einwachsverhalten von Kreuzbandplastiken

Die Vorstellungen über das Schicksal einer primär freien, avital transplantierten Sehne divergierten in der Vergangenheit erheblich. SEIFFERT (1967) diskutierte sowohl eine Überlebenstheorie als auch eine Ersatztheorie. Die Überlebenstheorie konnten durch KLEIN et al. (1972) widerlegt werden. Sie wiesen an Tritium-Prolin markiertem Sehnengewebe nach, dass sowohl in autogenen als auch in allogenen Transplantaten das markierte Kollagen durch nicht markiertes neugebildetes Kollagen ersetzt wird. Auch in späteren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Transplantat in den zentralen Bereichen schnell nekrotisch wird und lediglich in der Peripherie einige Zellen überleben (AMIEL et al. 1986b, GOERTZEN et al. 1998). Der synovialen Ernährung wurde in diesem Zusammenhang eine Schlüsselstellung für die zelluläre Repopulation des Transplantates eingeräumt (AMIEL et al. 1986a, KLEINER et al. 1989).

Das Interesse an den Vorgängen der biologischen Adaptation einer vorderen Kreuzbandplastik rückte in den letzten 15 Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Austausches. Experimentelle Studien schufen die Grundlagen für die schrittweise Aufdeckung der komplexen adaptiven Vorgänge der Bandheilung und des Transplantatumbaus (BALLOCK et al. 1989, BOSCH et al. 1990, McFARLAND et al. 1986, SCRANTON et al. 1998).

Prinzipiell sind beim Einwachsen eines vorderen Kreuzbandtransplantates zwei unterschiedliche Regionen zu betrachten. Man unterscheidet die knöcherne extraartikuläre Integration und den intraartikulären Umbau eines Transplantates.

Die ossäre Transplantatverankerung ist umfangreich untersucht (LIU et al. 1997b, PANNI et al. 1997, SCHIAVONE PANNI et al. 1993, SHOEMAKER et al. 1989, YOSHIYA et al. 2000). Die histologischen und immun-histochemischen Unterschiede einer chondralen und einer fibrösen zonen-differenzierten Insertion konnten nachgewiesen werden (PETERSEN und LAPRELL 2000, RODEO et al. 1993).

Dahingegen sind die Mechanismen und Einflußfaktoren für den intraartikulären Transplantatumbau ein weitgehend unbekanntes Feld und Gegenstand derzeitiger in-vitro und in-vivo Untersuchungen (FRANK et al. 1999, KOBAYASHI et al. 1997, KURODA et al. 2000, NG et al. 1996).

Die dynamischen Veränderungen vom Zeitpunkt der Transplantation eines biologischen Kreuzbandersatzes beinhalten die Umbauphasen Nekrose, Degeneration, Revaskularisierung, Revitalisierung, Rekollagenisierung und Remodeling. Diesen mehrphasigen Prozess bis hin zum morphologischen Kreuzbandersatz definierten AMIEL et al. (1986b) als Ligamentisation. Bei Erfolg dieses Prozesses wurden 30 Wochen post

operationem lichtmikroskopisch eine dem vorderen Kreuzband ähnliche Transplantatstruktur beobachtet.

In eigenen histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zwischen der Patellarsehne, dem Kreuzbandtransplantat und dem nativen vorderen Kreuzband eines Kaninchens wurden signifikante Unterschiede im Aufbau festgestellt (LABS 1993).

Zahlreiche durchgeführte experimentelle Studien konnten hinsichtlich der Ausrissfestigkeit der Transplantate auch nach 2-jähriger Beobachtungszeit eine unzureichende mechanische Festigkeit in Bereichen zwischen 15-60 % des vorderen Kreuzbandes erreichen (BALLOCK et al. 1989, BOSCH et al. 1990, CLANCY et al. 1981, KATSURAGI et al. 2000, McFARLAND et al. 1986, YOSHIA et al. 1987). Als Ursachen werden die Inhibition der Fibrillogenese durch das Proteoglykan Decorin (NAKAMURA et al. 2000), eine vermehrte Stickstoffmonoxidkonzentration (CAO et al. 2000), eine veränderte Glykosaminoglykanzusammensetzung, eine enzymatische Kollagenfaserdes-integration und eine erhöhte Kollagen-Typ III Synthese diskutiert (BOSCH et al. 1990). Alternativ wird ein höherer Wassergehalt der Transplantate als mögliche Ursache der verringerten Ausrissfestigkeit angegeben, da der Vaskularisationsgrad nicht mit der mechanischen Stabilität der Transplantate korrelierte (McFARLAND 1993).

Aus der Tatsache heraus, dass sowohl morphologisch als auch biomechanisch ein unvollständiger Transplantatumbau erfolgt, wird die Bezeichnung der Ligamentisation von einigen Arbeitsgruppen abgelehnt (BALLOCK et al. 1989, BOSCH et al. 1990).

Offene Fragen sind der Wirkungsmechanismus der Interzelluläraktion sowie die Aktivierung von Wachstumsfaktoren und kollagenaktivierenden Faktoren im Rahmen des Transplantatumbauprozesses.

Verschiedene Wachstumsfaktoren wurden entdeckt und deren Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in der Gewebsheilung untersucht (PIERCE et al. 1991, ROBERTS und SPORN 1993). In-vitro Studien berichteten auch über die Proliferationsstimulation von Fibroblasten des Bandapparates durch verschiedene Wachstums-faktoren (bFGF, TGF- β 1, PDGF) (MAURI et al. 1997, SCHMIDT et al. 1995, SPINDLER et al. 1996).

Diese Wachstumsfaktoren haben, insbesondere in der Frühphase der Bandheilung, einen positiven Einfluss. Sie stimulieren Angiogenese, Zell-proliferation (FOLKMAN und KLAGBRUN 1987) und Kollagensynthese (GREENHALGH et al. 1990). Aus diesem Grund wird ihnen eine wichtige Rolle im Regulationsprozess des Umbaus und der Reifung zugesprochen.

Die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf den Transplantatumbau von Kreuzbandplastiken ist bisher wenig untersucht. Experimentell ermittelte Daten zum Heilungspotential des am häufigsten verwendeten Bandmodells, des medialen Seitenbandes, können aufgrund der unterschiedlichen Morphologie, anatomischer Lokalisation, Nutrition und biochemischen Matrix-zusammensetzung sowie der differenten biomechanischen Funktion nicht übernommen werden (KOBAYASHI et al. 1997, LEE et al. 1995, MAURI et al. 1997, NEIL und LAURENCE 1993, PAUL et al. 1995, SCHMIDT et al. 1995). Eine unterschiedliche intrinsische Aktivität der Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und bFGF von Fibroblasten des medialen Seitenbandes gegenüber des vorderen Kreuzbandes wurde nachgewiesen (LEE et al. 1998).

KURODA et al. (2000) konnten erstmals immunhistochemisch im Patellar-sehnentransplanat bei Hunden einen Anstieg der intrinsischen Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und bFGF innerhalb der ersten 6 post-operativen Wochen zeigen. Bis zur 12. postoperativen Woche normalisierten sich jedoch diese Parameter. Es ist zu schlussfolgern, dass Wachstums-faktoren initial die Zellinfiltration und die Revaskularisation fördern, in den weiteren Umbauphasen jedoch an Bedeutung verlieren.

RODEO et al. (1999) berichteten über positive Effekte der knöchernen Bandeinheilung unter Zusatz eines BMP-2 tragenden Kollagen-Typ I Schwammes. Hierbei wurden höhere Ausrissfestigkeiten unter niedriger BMP-2 Applikation beobachtet.

Zur Verbesserung des Verständnisses der Wirkungsmechanismen von Band-heilung und Transplantatumbau wurden neue experimentelle Ansätze auf molekularer Ebene einschließlich der Gentherapie eingeführt. Letztendlich sind diese Entwicklungen zukunftsweisend. Perspektivisch ist durch die Transplantation gentransfizierter Zellen mit protrahierter Wachstumsfaktoren-freisetzung (HILDEBRAND et al 1999, MENETREY et al. 1999) die Optimierung des Transplantatumbaues und eine verbesserte biomechanische Stabilität zu erwarten.

2. Klinische Untersuchung

2.1 Literaturüberblick von Langzeituntersuchungen nach vorderer Kreuzbandchirurgie

Die Analyse von Langzeitresultaten nach vorderer Kreuzbandchirurgie mit einer minimalen Nachuntersuchungszeit von mehr als 5 Jahren ist nicht problemlos. Die publizierten Studienzahlen sind sehr begrenzt, die Patientenzahlen sind gering, die Techniken unterscheiden sich, die Nachuntersuchungskriterien sind recht uneinheitlich. Die Forderung nach einheitlichen und vergleichbaren Kriterien wurde erst Anfang der 90er Jahre durch eine Konsenstagung des International Knee Documentation Committee (IKDC) und der Einführung eines Standardevvaluationsblattes durchgesetzt (HEFTI et al. 1993). Die Tabelle 1 gibt einen Überblick aller publizierten Langzeituntersuchungen nach autologen vorderen Kreuzbandersatz mit einem Patellar- oder Quadrizepssehnentransplantat.

Tab. 1: Literaturüberblick – Langzeitresultate nach vorderer Kreuzbandchirurgie

Autor	Jahr	Nachuntersuchungs-zeit	Patienten	Technik	Resultate
Johnson et al.	1984	7,9 Jahre	87	Offen mediales 1/3 Lig. patellae	71 % subjektiv zufrieden, 69 % sehr gute und gute funktionelle Resultate 27 Patienten unbefriedigend 10 Transplantatversager, 11 Pat. vorderer Knieschmerz und 11 Pat. progressive Arthrose
Sandberg und Balkfors	1988	5 Jahre	89	Offen mediales 1/3 Lig. patellae	80 % sehr gute und gute Resultate, Sportniveau deutlich reduziert, Kniefunktion für ADL am besten wiederhergestellt

Autor	Jahr	Nachuntersuchungszeit	Patienten	Technik	Resultate
Kornblatt et al.	1988	5,5 Jahre	38	Offen zentrales 1/3 Quadrizeps- sehne	30/38 Patienten kein giving way, 5/38 leichte Instabilität, 3/38 Versager, pivot shift in 45 %, 21 % weiterhin subjektiv instabil
Howe et al.	1991	5,5 Jahre	83	Offen zentrales 1/3 Quadrizeps- sehne	77 % sehr gute und gute Resultate, 4 % unzufrieden 93% schmerzfrei, 95 % kein giving way, 87 % kein Lachman, 90 % kein pivot shift
Holmes et al.	1991	> 5 Jahre	27	Offen zentrales 1/3 Lig. patellae	16x exzellent, 7x gut, 3x befriedigend, 1x schlecht
Mok und Dowd	1993	7,5 Jahre (5-10 Jahre)	30	Offen zentrales 1/3 Lig. patellae	27/30 Patienten sehr gute und gute Resultate im Lysholm und Gillquist Score, kein Patient mit patellofemorale Schmerzen, 2 Pat. unzureichendes Resultat
Mitsou und Villianatos	1996	5-9 Jahre	334	Offen laterales 1/3 Lig. patellae	Lysholm 89,5 % exzellente und gute Resultate, 10,5 % unbefriedigend KT-1000 (89N) < 3mm – 78 %
Grontvedt et a.	1996	5 Jahre	50	Offen zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm: Ø 93,3 Punkte Tegner: Ø 5,1; 13 % Flexionsdefizit > 10° KT-1000 < 3mm – 79 %
Natri et al.	1996	6,6 Jahre	32	Offen mediales 1/3 Lig. patellae	50% der Patienten subjektiv zufrieden, 57 % exzellent und gut im Lysholm-Score, Lachman in 59 % und pivot shift in 69 % negativ

Autor	Jahr	Nachuntersuchungszeit	Patienten	Technik	Resultate
Aglietti et al.	1997	7 Jahre	89	Arthroskopisch zentrales 1/3 Lig. patellae	giving way 8 %, Schmerzen 8 %, KT-2000 >5mm in 16 %, Extensionsdefizit 3-5° - 22 %, 6-10° - 4%, IKDC: A-21 %, B-56 %, C-19 %, D-3 %
Jomha et al.	1999 (b)	7 Jahre	59	Arthroskopisch zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm: Ø 94 Punkte, IKDC: A-20,3%; B-55,9 %; C-22%; D-1,69 %, KT-1000 < 3mm – 49,1 %
Hertel et al.	1999	9,8 Jahre	33	offen via Miniarthrotomie Zentrales 1/3 Lig. patellae (implantatfrei)	Streckdefizit < 3° - 47 %, 3-5° -- 47 %, Beugedefizit < 5° - 80 %, 6-15° - 13 %; KT-1000 <2mm – 70 %, 3-5mm – 30 %; IKDC A-10 %, B-70 %, C-17%, D-3 %
Marumo et al.	2000	9,1 Jahre	102	arthroskopisch zentrales 1/3 Lig. patellae	KT-1000 < oder = 5mm Seit-zu-Seitdifferenz in 90 % der Patienten
Patel et al.	2000	5,8 Jahre	32	Arthroskopisch zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm: Ø 88,5 Punkte Tegner: Ø 5,1 KT-1000 < 3mm – 87 %
Pokar et al.	2001	5 Jahre (56-63 Mo.)	76	Arthroskopisch zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm: Ø 94,6 (66-100) Punkte IKDC: A-21,7 %; B-57,9 %; C-19,7 %; D-1,3 % KT-1000 < 3mm - 55,3 %
Peterson et al.	2001	5,2 Jahre	30	Arthroskopisch zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm: Ø 88,6 Punkte Tegner: Ø 6,1 KT-1000 < 3mm – 66,6 %

Autor	Jahr	Nachuntersuchungszeit	Patienten	Technik	Resultate
Järvelä et al.	2001	5-9 Jahre	72 34 (A) nur VKB 38 (B) + andere Läsionen	Mini-open zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm Ø 86 vs. 83 Punkte; Marshall Ø 43 vs. 42 Punkte, IKDC: Gruppe A: A-10, B-19, C-5; Gruppe B: A-9, B-24, C-5; ROM normal und fast normal 88 % Gruppe A und 95 % Gruppe B
O'Neill	2001	> 6 Jahre	225	Arthroskopisch 3 Gruppen STT vs Lig. patellae	92 % gute funktionelle Ergebnisse, signifikante Unterschiede in Muskelkraft der Beuger und Strecker 11,6 % der Patienten mit deutlicher Arthrose
Jäger et al.	2001	9,5 Jahre	75	arthroskopisch, zentrales 1/3 Lig. patellae	Lysholm Ø 91,6 Punkte, Tegner Ø 5,2; Rolimeter <2mm - 82,8 %, 3-5mm - 14,4 %, pivot shift 94,6 % negativ, 31,1 % Transplantatentnahmemorbidität 51,3 % der Patienten Zunahme der Arthrose

2.2 Fragestellung

Ziel der retrospektiven Studie war es, die eigenen Operationsresultate aus den Jahren 1981–1990 klinisch als auch radiologisch mit etablierten Evaluierungskriterien zu untersuchen und ein Vergleich zwischen isolierter vorderer Kreuzbandrekonstruktion und vorderer Kreuzbandrekonstruktion in Kombination mit einer Meniskusresektion hinsichtlich des Langzeitergebnisses zu geben.

2.3 Material und Methoden

Im Zeitraum von 1981 bis 1990 wurden in der Orthopädischen Universitätsklinik der Charité insgesamt 85 vordere Kreuzbandplastiken durchgeführt. Zur Anwendung kamen verschiedene Techniken unter Verwendung eines Fascia lata-Transplantats (n=16), eines Carbonfaser-Implantats (Lafil®) (n=12) oder mittels dem autologen medialem Lig. patellae-Transplantats (n=57). In 13 Fällen handelte es sich um komplexe Knie-gelenktraumen, wo zusätzliche Eingriffe wie mediale oder laterale Seiten-bandnähte bzw. -plastiken oder ventro-mediale Kapselplastiken durchgeführt wurden.

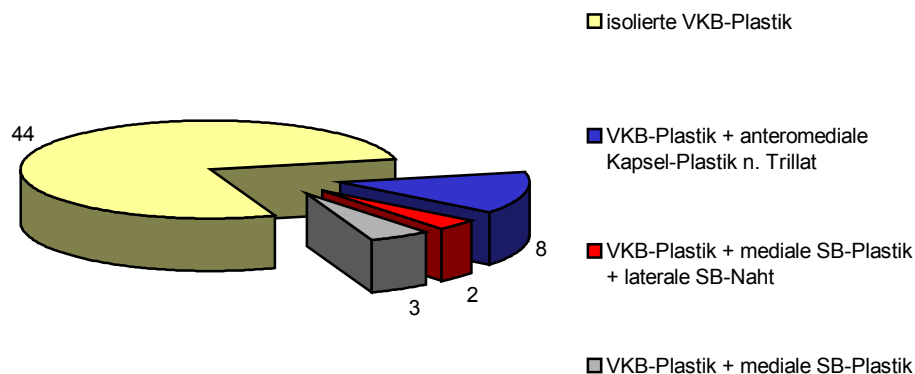


Abb. 1: Verteilung der VKB-Plastiken mit dem Patellarsehnentransplantat im Zeitraum 1981 - 1990

Diese wurden aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit mit den isolierten vorderen Kreuzbandrekonstruktionen von der Nachuntersuchung ausgeschlossen. Es verblieben 44 Patienten, welche ein Patellarsehnen-transplantat und wenn erforderlich, einen zusätzlichen operativen Eingriff an den Menisken erhielten. Von diesen Patienten waren 2 nicht mehr auffindbar, 1 Patient war durch einen Verkehrsunfall zwischenzeitlich verstorben und 2 Patienten lehnten eine Nachuntersuchung aufgrund der zeitlichen Belastung ab.

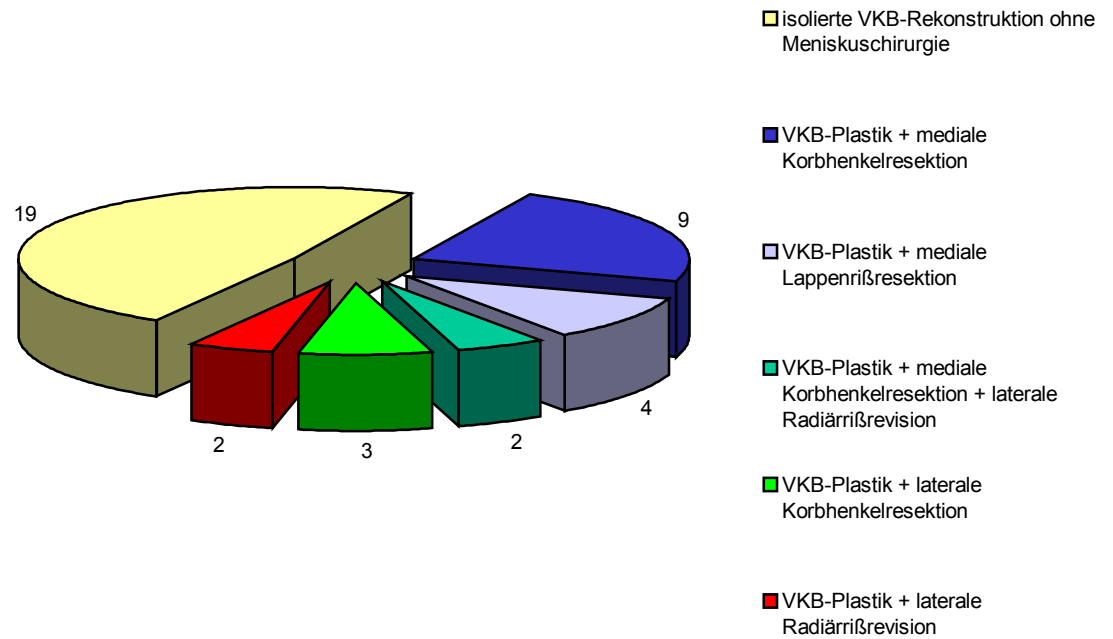


Abb. 2: Verteilung der 39 nachuntersuchten Patienten einschließlich der vorhandenen Meniskuspathologie

Insgesamt konnten 39 Patienten (88,6%) nachuntersucht werden. Die Patienten wurden in zwei Gruppen, bestehend aus Gruppe A (isolierte vordere Kreuzbandrekonstruktion) und Gruppe B (vordere Kreuzbandrekonstruktion mit partieller Meniskusresektion) unterteilt.

2.3.1 Patientendaten

Tab. 2: Demographische Daten der nachuntersuchten Patienten (n = 39). In Klammern jeweils Standardabweichung und Minimum-Maximum-Wert.

	Gruppe A (n = 19)	Gruppe B (n = 20)	Signifikanz
Geschlecht (m/w)	14 / 6	13 / 6	n.s.
Seite (rechts/links)	12 / 7	13 / 7	n.s.
Alter zur Op (Jahre)	24 (+/- 4, 13 – 40)	32 (+/- 12, 12 – 50)	P < 0,05
Intervall Unfall – Op (Monate)	6 (+/- 2,2; 2 – 24)	16 (+/- 2,4; 1 – 96)	P < 0,05
Nachuntersuchung (Jahre)	13,2 (+/- 2; 11-19)	13,8 (+/- 3; 11– 20)	n.s.

In der Mehrzahl handelte es bei den Unfallereignissen um Sportunfälle; entsprechend hoch war der TEGNER-Score vor dem Unfall. Zum Operationszeitpunkt waren keine bedeutsamen degenerativen radiologischen Veränderungen der operierten Kniegelenke vorhanden.

2.3.2 Operationstechnik

Alle Patienten wurden in einer offenen Operationstechnik versorgt. Über einen modifizierten medialen Payr-Schnitt erfolgte die Arthrotomie und die Inspektion der Kreuzbänder, des Knorpels und der Menisken. Bei 20 Patienten war eine partielle Meniskusresektion erforderlich. Eine Menisko-pexie erfolgte in keinem Fall.

Die Transplantatgewinnung wurde jeweils aus dem medialem Drittel der Patellarsehne durchgeführt. Je nach Kniegelenkdimension wurde ein 9 – 10 mm Streifen aus der Patellarsehne gewonnen. An den Enden der Sehne wurden aus dem distalen Patellapol ein 20 x 10 mm starker zylindrischer Knochenblock gewonnen und aus der Tuberositas tibiae ein konischer Knochenblock von 25 mm Länge. Nach der Präparation des Transplantates wurde dieses von freien Faseranteilen und Fettgewebe befreit. Der kleinere zylindrische Knochenblock wurde über Bohrungen paarig armiert. Nach der Entfernung von rudimentären Bandstümpfen des vorderen Kreuzbandes und von Weichteilgewebe aus der Fossa intercondylaris sowie insbesondere der lateralen Wand der Fossa wurden die Bohrkanäle von 9-10 mm angelegt. Diese wurden zum damaligen Zeitpunkt ohne Zielgerät durchgeführt. Der tibiale Bohrkanal wurde dabei durchgängig aufgebohrt und an seiner Eintrittspforte leicht konisiert. Femoral erfolgte die Tiefenbohrung nur bis maximal 30 mm. Zusätzlich wurden kleinere Bohrkanäle (2,3 mm) durch den gesamten lateralen Femurkondylus zur Außenseite gebohrt. Diese Kanäle dienten dem Durchzug der Armierungsfäden. Über eine knöcherne Brücke auf der Außenseite des distalen Femurkondylus erfolgte die proximale Fixierung des

Transplantates. Die Kniebeugestellung während der Trans-plantatfixierung variierte zwischen 30-45° Flexion.

2.3.3 Nachbehandlung

Unmittelbar postoperativ wurden die Kniegelenke in 20° Flexion in einem Gipstutor für 6 Wochen unter Vollentlastung ruhiggestellt. Nach Gips-abnahme erfolgte eine umfangreiche physiotherapeutische Rehabilitation, teilweise unter vollstationären Bedingungen. Einschränkungen des Be-wegungsumfanges wurden ab der 7. postoperativen Woche nicht mehr vor-gegeben. Im Vordergrund der Rehabilitation stand die Wiedererlangung der Beweglichkeit, hier insbesondere die Streckung und der Muskelaufbau.

2.3.4 Evaluierung

Zur Evaluierung der Ergebnisse wurden folgende Parameter erfasst:

- Klinische Untersuchung
- Komplikationsanalyse
- TEGNER-Score
- LYSHOLM-Score
- IKDC-Standard evaluationsblatt
- Instrumenteller Laxitätstest (KT-1000)
- Röntgenanalyse
- Visuelle analog Skalen

Die klinische Untersuchung umfasste die Bestimmung der Beinachsen, des Bewegungsumfanges und einen kompletten Kniegelenkstatus, einschließlich einer Muskelumfangsmessung an standardisierten Landmarks.

In der Komplikationsanalyse wurden die Aktenunterlagen studiert und die Patienten hinsichtlich notwendiger Gelenkpunktionen, Mobilisationseingriffe und Revisionsoperationen sowie allgemeiner Komplikationen nach chirurgischen Eingriffen befragt.

Der TEGNER-Score (1985) entspricht einer Graduierung von 0 – 10 in Bezug auf den sportlichen Aktivitätsgrad.

Der LYSHOLM-Score wurde zur Evaluierung von Kniegelenkinstabilitäten entwickelt (LYSHOLM und GILLQUIST 1982). Es handelt sich hierbei um einen metrischen Score mit einer maximalen Punktezahl von 100. Es werden die Kriterien Hinken, Gehhilfen,

Treppensteigen, Hocken, Instabilität, Schmerz, Schwellung und Muskelatrophie erfasst. Dieser Score ist sehr weit verbreitet, besitzt allerdings den Nachteil einer Überbewertung von subjektiven Parametern (LABS und PAUL 1997).

Das IKDC-Standardvaluationsblatt wurde aus der Konsequenz heraus entwickelt, eine internationale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, da bis zu diesem Zeitpunkt eine Vielzahl von nicht vergleichbaren Scores eingesetzt wurden (LABS und PAUL 1997). Die Mitglieder der American Orthopaedic Society for Sports Medicine (AOSSM) und der European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy (ESSKA) haben somit einen Standard erarbeitet, der die wesentlichen Kriterien zur Ergebnisbeurteilung beinhaltet ohne subjektive, objektive oder funktionelle Kriterien über- oder unterzubewerten. Dieses Evaluationsblatt (siehe Anhang) ist in 8 Untergruppen unterteilt und beinhaltet folgende Kriterien: Subjektive Kniegelenkfunktionseinschätzung durch den Patienten, Kniegelenksymptome, Bewegungsumfang, Bandstabilität, Kompartimentveränderungen, Transplantatentnahmepathologie, Röntgenbefunde und einen Funktionstest. Für das Endresultat werden nur die ersten 4 Untergruppen herangezogen. Die Graduierung der abgefragten Kriterien erfolgt in: Normal, fast normal, abnormal und erheblich abnormal.

Die instrumentelle Stabilitätsmessung mit dem von DANIEL et al. (1985) entwickelten Messgerät (KT-1000) ermöglicht eine metrische Angabe der ventralen Translationsbewegung des Schienbeinkopfes gegenüber den Femurkondylen unter definierter oder maximaler Kraft. Als weitverbreiteter Parameter zur Befundobjektivierung gilt die Messung unter 89N und der so genannte „manuell-maximum-Test“ in der Seitendifferenz. Nachteil dieses Verfahrens ist die nachgewiesene intra- und interindividuelle Messungenauigkeit und die Nichtberücksichtigung von rotatorischen Komponenten.

Zur Objektivierung der osteoarthrotischen Veränderungen der Kniegelenke wurde die IKDC-Klassifikation für das patellofemorale sowie das mediale und laterale femorotibiale Kompartiment ausgewertet. Die Röntgenaufnahmen wurden in drei Ebenen angefertigt (Patella axial, streng seitlich in Streckung und p/a unter Körpergewichtsbelastung im Stand).

Als Kriterium zur Osteoarthrosebewertung wurde die Verschmälerung des Gelenkspaltes genommen. Einem Normalbefund (Kategorie A) entsprach dem Befund keiner Gelenkspaltveränderung, ein fast normaler Befund (Kategorie B) wurde definiert als Gelenkspaltannäherung ($> 4\text{ mm}$) und die Ausbildung von kleinen Osteophyten. Ein abnormaler Befund (Kategorie C) entsprach einer Gelenkspaltverringerung zwischen 2-4 mm und zusätzlich das Vorhandensein von Osteophyten und subchondralen

Reaktionszonen. Der deutlich abnormale Befund (Kategorie D) wurde definiert bei einer Gelenkspaltverringernng unter 2 mm (AGLIETTI et al. 1997).

Die Patellahöhe wurde radiologisch anhand des BLACKBURN/PEEL-Index (1977) bestimmt. Dieser Index misst den Abstand zwischen dem Tibiaplateau und dem unteren Rand der Patellagelenkfläche. Dieser Index besitzt nach SEIL et al. (2000) die geringste interobserver Variabilität. Die Normwerte liegen für eine Patella norma bei 0,8, einer Patella alta $> 1,0$ und für eine Patella baja $< 0,5$. Die präoperativen Befunde des Osteoarthrose-Scores und der Patellahöhe wurden mit den Befunden zum Nachuntersuchungszeitpunkt verglichen.

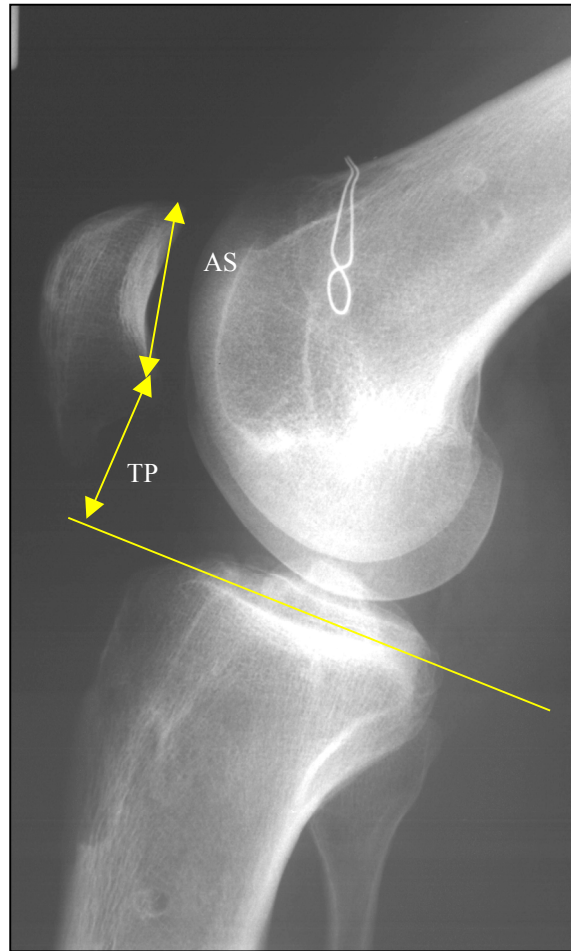


Abb. 3: Darstellung der radiologischen Bestimmung der Patellahöhe nach BLACKBURN und PEEL (1977)

Die Beschreibung der Bohrkanallage am Femur erfolgte nach der beschriebenen Methode von BERNARD und HERTEL (1996). Hierfür wird eine Tangente zur Blumensaat-Linie angelegt und parallel zum tiefsten Punkt des lateralen Kondylus. Eine senkrechte Tangente bildet die Strecke H, welche die Höhe der Fossa intercondylica entspricht. Parallel zur Tangente H bilden im frontalen und dorsalen Kondylenende jeweils die Begrenzung der Notch. Der zentrale Bohrkanalpunkt wird mittels Hilfslinien von der kranialen und dorsalen Begrenzung der Fossa intercondylica in Prozent angegeben. Der zentrale Punkt der anatomischen Insertion des vorderen Kreuzbandes liegt nach der Studie von BERNARD und HERTEL (1996) 24,8 % vor der Hinterkante der Femurkondyle bezogen auf die Gesamtlänge der Interkondylärgrube und 28,5 % kaudal der kranialen Begrenzung der Interkondylärgrube (Abb. 4).

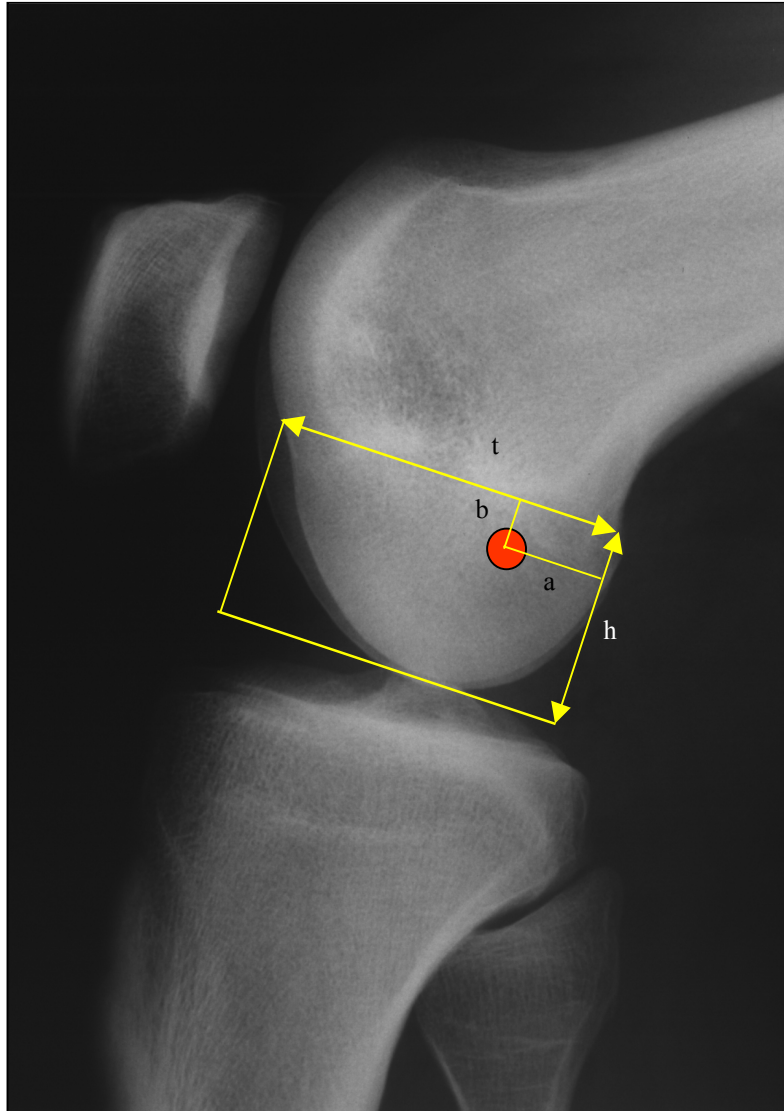


Abb. 4: Radiologische Ausmessung der femoralen Insertion in der Methode nach BERNARD und HERTEL (1996)

Für die Ausmessung des tibialen Bohrkanals wird die sagittale Länge der proximalen Tibiaausdehnung und der zentrale Durchtrittspunkt des Bohrkanals in das Gelenk bestimmt. Nach einer Studie von STÄUBLI und RAUSCHNING (1994) liegt der optimale Punkt für das vordere Kreuzband im Abstand von 44 % der Gesamttibiallänge von ventral (Abb. 5).

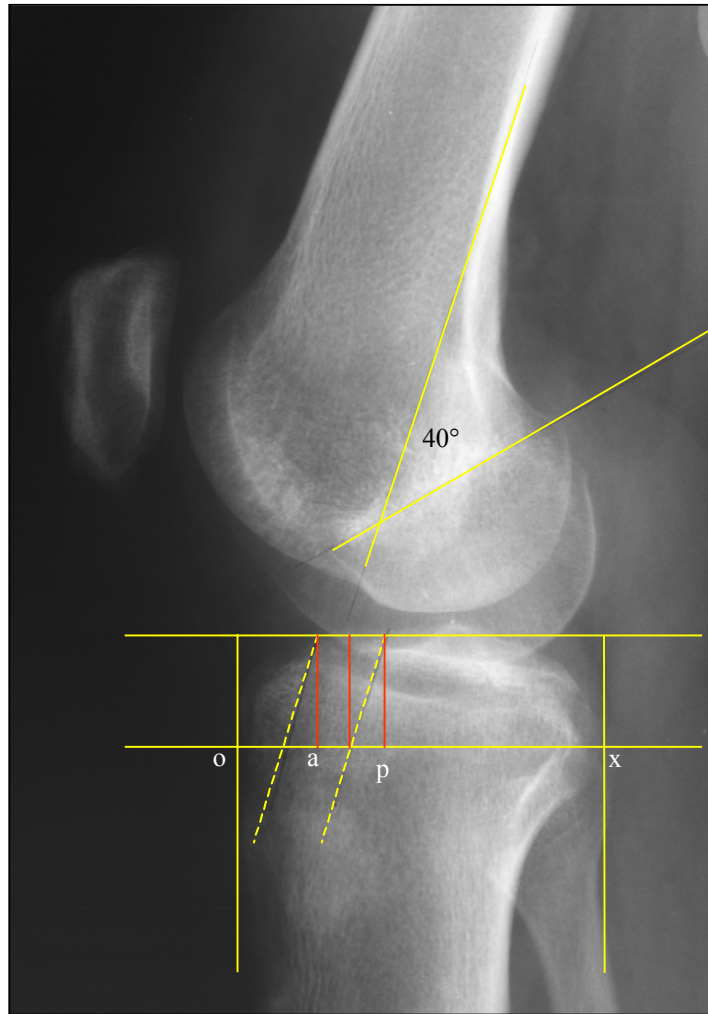


Abb. 5: Radiologische Ausmessung der Lage des tibialen Bohrkanals nach STÄUBLI und RAUSCHNING (1994) sowie des Interkondylendachwinkels nach SCUDERI (1993)

Als weiteren radiologischen Parameter zur Einschätzung des Zusammenhanges von Bohrkanallage und Transplantatlage wurde der Impingement-Index nach JÄGER (2000) bestimmt. Hierfür wird der Winkel α , der aus einer Tangenten der Blumensaat-Linie und des Transplantatverlaufes sowie dem aktuellen Flexionswinkel β zwischen den Parallelen der dorsalen Kortikalis von Femur und Tibia gebildet wird (Abb. 6). Laut JÄGER (2000) kann aus dem Quotienten zwischen α und β eine Aussage über ein Transplantatimpingement mit daraus resultierenden Streckdefiziten getroffen werden. Ist dieser Quotient < 1 sind die Voraussetzungen für ein Transplantatimpingement gegeben.

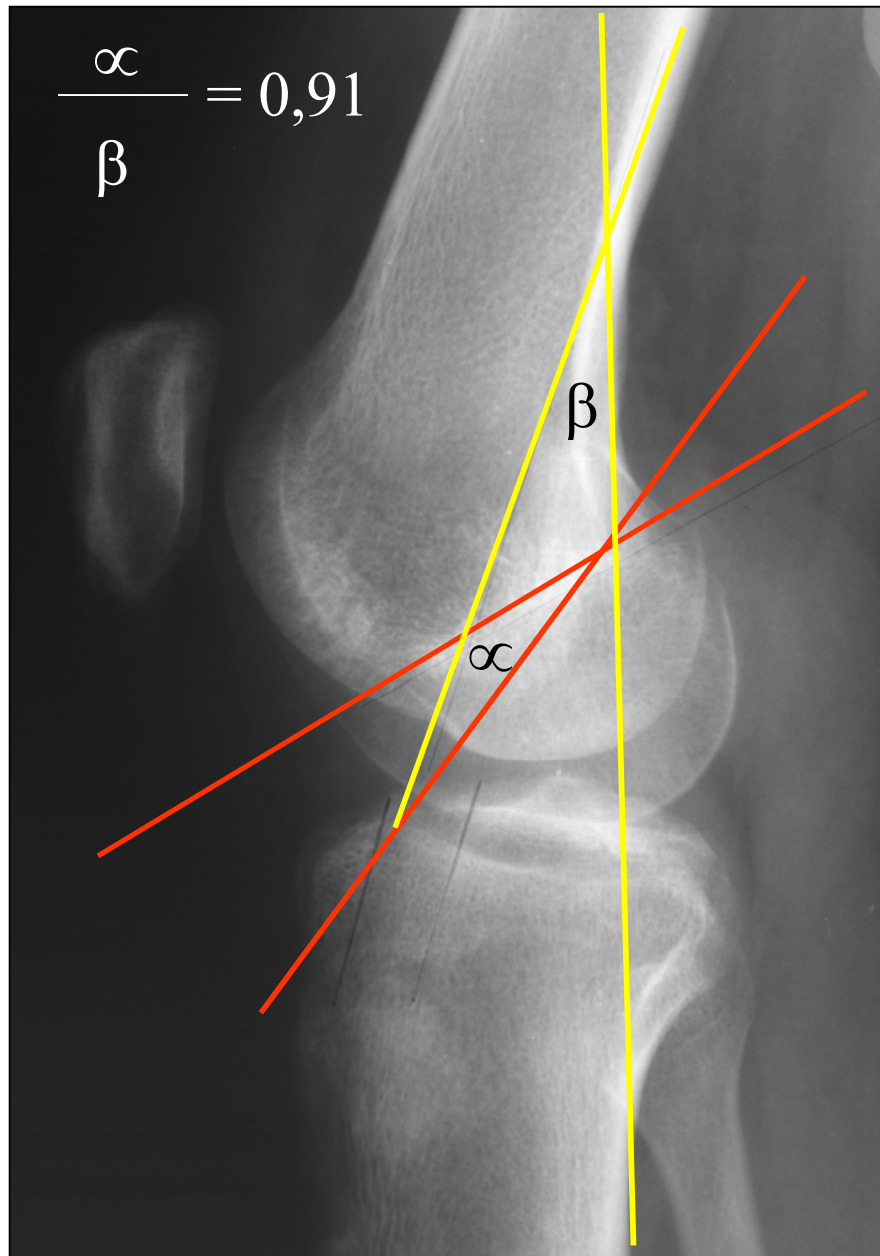


Abb. 6: Radiologische Ausmessung des Impingement-Index nach JÄGER (2000).

Im Weiteren wurden mit Hilfe von visuellen analog Skalen subjektive Einschätzungen der Patienten zur Kniegelenkfunktion erfasst. Dabei entspricht 0 auf der Skala, dass zum Beispiel das Kriterium Schmerz nicht vorhanden ist und 10, dass die Schmerzausprägung am stärksten ist.

Die Nachuntersuchung der Patienten erfolgte von einem unabhängigen Kollegen, welcher nicht an den Primäreingriffen beteiligt war. Die radiologischen Parameter wurden von drei unabhängigen Untersuchern ausgewertet (zwei Orthopäden, ein Radiologe).

2.4 Statistik

Für nichtparametrische Daten (Lysholm Score, Tegner Scale, IKDC-Evaluation, Arthrosegraduierung, Bohrkanalraten, Impingement-Index) wurde der Mann-Whitney U-Test zur Analyse der Gruppendifferenzen genutzt. Für parametrische Daten (Patientenalter, Intervall vom Unfallzeitpunkt bis zur OP, Stabilitätsmessung, Bewegungsumfang) wurde der T-Test für gepaarte Stichproben eingesetzt. Gruppenunterschiede wurden im Weiteren mit chi-Quadrat-Test analysiert. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für $p = 0,05$ festgelegt.

Eine Korrelationsanalyse nach Spearman wurde für den Impingement-Index und dem postoperativem Streckdefizit durchgeführt.

Die Berechnungen erfolgten nach der Primärdatenerfassung im Kalkulationsprogramm Excel 97[®] (Microsoft, Seattle, USA) und nach Übertragung die statistische Auswertung im Programm SPSS Version 10 (SPSS Inc. Chicago, USA) auf einem handelsüblichen Personalcomputer.

2.5 Klinische Resultate

Die mittlere Nachuntersuchungszeit für beide Patientengruppen betrug 13,8 Jahre (Min.-Max. 11 – 20 Jahre). Das mittlere Alter zur Nachuntersuchung war 40 Jahre (Min.-Max. 32 – 68 Jahre). Die Gruppe A hatte statistisch signifikant ($p < 0,05$) ein jüngeres Patientengut.

Als Komplikationen und weitere chirurgische Maßnahmen wurden folgende Daten erhoben:

Tab. 3: Übersicht von Komplikationen und Nachoperationen, * $p < 0,05$

	Gruppe A	Gruppe B
Brisement	1	3
offene Arthrolyse	-	1
partielle Menishektomie	-	2
valgierende Tibiakopfeosteotomie	1	3
Wundheilungsstörungen	1	-
Knieinfekt	-	1
Summe	3	10*

Der präoperative TEGNER-Score betrug im Mittel 6,1 Punkte. Nach dem Unfall reduzierte sich dieser Wert auf durchschnittlich 1,6 Punkte. Zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung konnte das ursprüngliche Niveau nicht erreicht werden und lag im Mittel bei 4,5 Punkte.

Tab. 4: Mittlerer Tegner-Score und Minimum-Maximumwert. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Gruppe A. (NU = zur Nachuntersuchung)

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A + B
vor dem Unfall	6,1 (1-8)	6,3 (1-9)	6,1 (1-9)
nach dem Unfall	1,8 (0-3)	1,7 (0-3)	1,6 (0-3)
zur NU	4,8 (2-7)	4,3 (1-6) *	4,5 (1-8)

Der präoperative LYSHOLM-Score wurde zur Evaluierung routinemäßig erst Ende der 80-er Jahre eingesetzt, so dass ein Vergleich von prä- und postoperativen Daten nicht möglich ist. Der Mittelwert des LYSHOLM-Scores zur Nachuntersuchung betrug 72,3 Punkte mit einem Minimum– Maximumwert von 32-100 Punkten. Zwischen den Gruppen A und B gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tab. 5: Übersicht der Mittelwerte sowie Minimum- und Maximumwerte der einzelnen Kategorien im LYSHOLM-Score

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A + B
Hinken (5)	4,2 (3-5)	4,1 (3-5)	4,1 (3-5)
Stützen (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
Treppensteigen (10)	5,8 (3-10)	5,4 (2-9)	5,5 (2-10)
Hocken (5)	2,6 (0-4)	2,8 (0-5)	2,75 (0-5)
Instabilität (30)	24,1 (10-30)	21,8 (10-30)	22,6 (10-30)
Schmerz (30)	20,8 (5-30)	21,3 (5-30)	21,7 (5-30)
Schwellung (10)	6,7 (2-10)	6,8 (2-10)	6,75 (2-10)
Atrophie (5)	3,8 (3-5)	3,6 (3-5)	3,8 (3-5)
Summe (100)	73 (46-100)	70,8 (32-96)	72,3 (32-100)

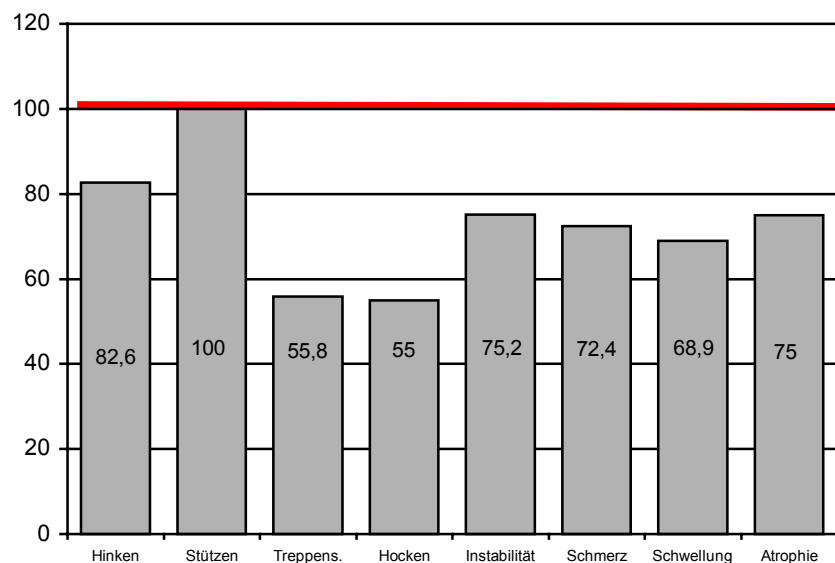


Abb. 7: Prozentual maximal erreichte Punktzahl pro Einzelkriterium im Lysholm-Score für Gruppe A und B (n = 39)

Die größten Abweichungen von der Maximalpunktzahl waren in den Kriterien Treppensteigen und Hocken beobachtet worden. Diese Werte waren annähernd um die Hälfte reduziert. Dagegen zeigten die anderen untersuchten Kriterien nur etwa eine Reduktion um $\frac{1}{4}$ der maximal erreichbaren Punktzahl. Lediglich das Kriterium der Notwendigkeit von Gehhilfen (support) erreichte die volle Punktzahl bei allen Patienten.

Im *IKDC Gesamtergebnis* erreichten unter Berücksichtigung der 4 Hauptkriterien (Patienteneinschätzung, Kniegelenksymptome, Bewegungs-umfang, Instabilität) 4 Patienten (10,3 %) ein normales (A), 17 Patienten (43,6 %) ein fast normales (B) Resultat. Das heißt nach IKDC-Kriterien konnten lediglich 53,9 % der Patienten ein akzeptables Ergebnis erreichen.

Die Kategorie C (abnormal) erreichten 13 Patienten (33,3 %) und Kategorie D (erheblich abnormal) 5 Patienten (12,8 %).

Zwischen den Vergleichsgruppen A und B gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gesamtergebnis (Abb. 8).

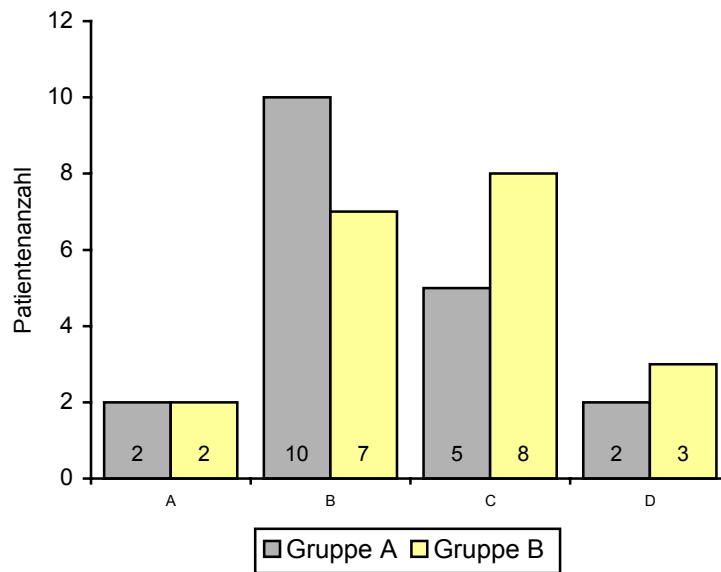


Abb. 8: Endresultat des IKDC Evaluationsschema ((A) – normal, (B) – fast normal, (C) – abnormal, (D) – erheblich abnormal)

Während in der Gruppe A 12 Patienten (62,9 %) ein normales oder fast normales Ergebnis erreichten, waren es in der Gruppe B insgesamt nur 9 Patienten (45 %).

Die differenzierte Betrachtung der Einzelkategorien zeigte für das Kriterium *subjektive funktionelle Patientenselbsteinschätzung* für 11 Patienten (28,2 %) die Kategorie A, für 16 Patienten (41 %) die Kategorie B und für 12 Patienten (30,8 %) die Kategorie C. Ein deutlich abnormal funktionierendes Kniegelenk (Kategorie D) wurde von keinem Patienten angegeben. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede in den Gruppe A und B gefunden.

In der zusammenfassenden *Symptomeinschätzung* (Schmerz, Schwellung, giving-way) zeigten 17 Patienten (43,6 %) ein normales und 12 Patienten (30,8 %) ein fast normales Ergebnis. Jeweils 5 Patienten (12,8 %) erreichten die Kategorie C und D.

Die Ursachen für die nichtzufriedenstellenden Ergebnisse waren der Schmerz und rezidivierende Instabilitätsepisoden (partiell giving way). Insbesondere zeigte sich dies mit einem zahlenmäßigen Überwiegen in der Gruppe B.

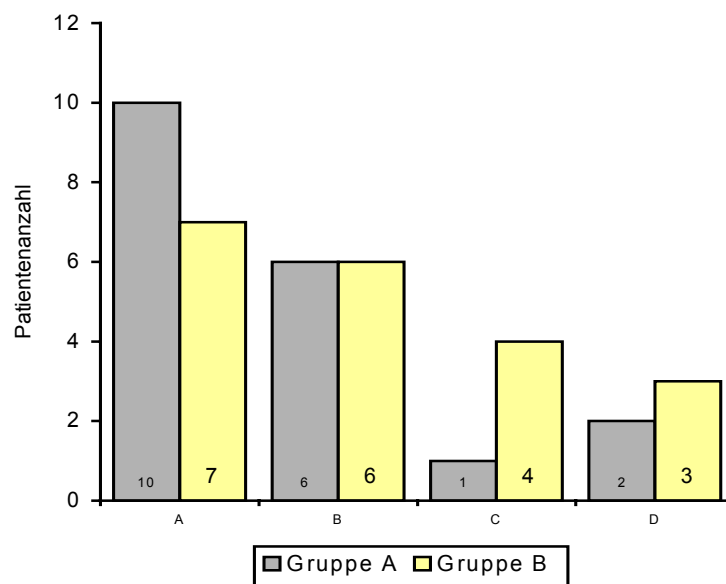


Abb. 9: Schmerzeinschätzung im IKDC Evaluationsschema ((A) – normal, (B) – fast normal, (C) – abnormal, (D) – erheblich abnormal)

Für die Untergruppe Bewegungsumfang wurde für 5 Patienten (12,8 %) die Kategorie A und für 20 Patienten (51,3 %) die Kategorie B dokumentiert. Deutliche Einschränkungen der Beweglichkeit demonstrierten 14 Patienten (35,9 %), welche lediglich die Kategorie C erreichten.

Das Bewegungsausmaß zeigte in der Gruppe A für 15 Patienten (78,9 %), aber lediglich für 10 Patienten (50 %) der Gruppe B ein normales oder fast normales Resultat. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Es ist allerdings erforderlich auch dieses Gesamtergebnis zu relativieren, in dem die Bewegungsrichtungen Extension und Flexion getrennt betrachtet werden (Tab. 6).

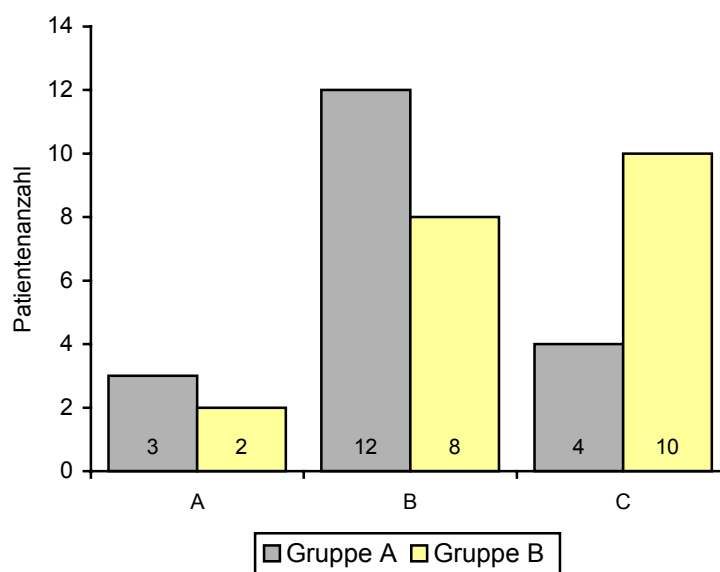


Abb. 10: Bewegungsausmaß (Flexion und Extension) als Gesamtergebnis im IKDC-Evaluationblatt ((A) – normal, (B) – fast normal, (C) – abnormal, (D) – erheblich abnormal)

Tab. 6: Aufteilung der Bewegungsdefizite für Extension und Flexion

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A + B
Extensionsdefizit			
< 3°	2	6	8 (20,5 %)
3° – 5°	14	12	26 (66,6 %)
6° - 10°	2	3	5 (12,8 %)
>10°	-	-	-
Flexionsdefizit			
< 5°	4	3	7 (17,9 %)
6° – 15°	10	10	20 (51,3 %)
16° - 25°	5	7	12 (30,8 %)
>25°	-	-	-

Die Mehrzahl der Patienten (66,6 %) zeigten Einschränkungen in der Extension im Bereich von 3°- 5°. Aber auch bei 5 Patienten (12,8 %) existierten markante Extensionsdefizite im Bereich von 6°- 10°.

Aus den Ergebnissen des Bewegungsumfanges wird ersichtlich, dass die Anzahl der Patienten mit einem physiologischen Bewegungsumfang extrem gering ist. Während die Extension noch zu weitestgehend akzeptablen Ergebnissen führte, war die Flexion bei immerhin 30,8 % der Patienten im Bereich von 16° – 25° eingeschränkt. Dies reflektierte auch die Unzufriedenheit zahlreicher Patienten nicht mehr in die tiefe Hocke gehen zu können. Insbesondere von den weiblichen Patienten wurde dies als einschränkend angegeben.

Der instrumentelle Lachman-Test mit dem KT-1000 zeigte in der Seitendifferenz folgende Werte:

Tab. 7: Übersicht der Ergebnisse der instrumentierten Instabilitätsmessung in der Seitendifferenz mit Angabe der Min.-Max.-werte. Keine signifikanten Unterschiede.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A + B
67N	0,91 (0 – 2)	0,90 (0 – 2)	0,89 (0 – 2)
89 N	1,44 (1 – 3)	1,32 (0 – 2)	1,34 (0 – 2)
134 N	2,3 (0 – 4)	2,2 (1 – 3)	2,30 (0 – 3)
manuell maximum	3,2 (2 – 5)	2,9 (1-4)	2,89 (1 – 5)

Die Mehrzahl der Kniegelenke zeigten eine nur geringfügige ventrale Translation. Insgesamt 13 Patienten (33,3 %) erreichten eine ventrale Translation bis zu 2 mm und 26 Patienten (66,6 %) ein maximales Ausmaß von 3 – 5 mm entsprechend bezogen auf die unverletzte Gegenseite.

Der pivot shift-Test war bei 30 Patienten (76,9 %) negativ und bei 8 Patienten (20,5 %) einfach positiv (glide) und bei einem Patienten zweifach positiv (clunk).

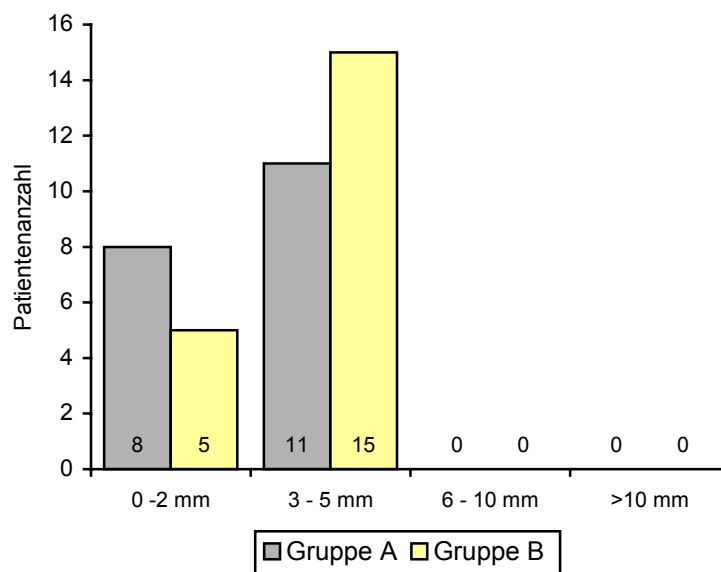


Abb. 11: Übersicht der Ergebnisse der instrumentierten Instabilitätsmessung für den manual maximum-Test hinsichtlich der Gruppenunterschiede. ((0 – 2mm) – normal, (3 – 5mm) – fast normal, (6 –10mm) – abnormal, (> 10mm) – deutlich abnormal)

Die Auswertung des Einbeinsprunges im Vergleich zur nichtoperierten Seite ergab einen Prozentbereich von 90–100 % für 7 Patienten (17,9 %), von 76-90 % für 21 Patienten (53,8 %), von 50-75 % für 8 Patienten (20,5 %) und weniger als 50 % für 3 Patienten (7,7 %). Unberücksichtigt bleibt bei dieser Auswertung, welche Seite das Sprungbein des Patienten ist. Die Mehrheit der Patienten (71,7 %) erreichten Längenwerte, die größer als 75 % der nichtbetroffenen Seite waren.

Der Vergleich der präoperativen und postoperativen Röntgenbilder zum Nachuntersuchungszeitpunkt zeigte eine Zunahme der Arthrose. Hierbei war vor allem das mediale Kompartiment in der Gruppe B betroffen. Das patellofemorale und das laterale femorotibiale Kompartiment waren nur unbedeutend von degenerativen Veränderungen gezeichnet.

Tab. 8: Patellofemorale Osteoarthritis präoperativ und zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung (NU).

	Gruppe A präop	Gruppe A NU	Gruppe B präop	Gruppe B NU
patellofemoral				
(A) normal	16	12	17	14
(B) fast normal (> 4 mm)	3	7	3	5
(C) abnormal (2-4 mm)	-	-	-	1
(D) deutlich abnormal (<2 mm)	-	-	-	-

Tab. 9: Femorotibiale Osteoarthritis des medialen Kompartments präoperativ und zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung (NU).

	Gruppe A präop	Gruppe A NU	Gruppe B präop	Gruppe B NU
femorotibial medial				
(A) normal	18	7	19	1
(B) fast normal (> 4 mm)	1	10	1	9
(C) abnormal (2-4 mm)	-	2	-	10
(D) deutlich abnormal (<2 mm)	-	-	-	-

In der Gruppe A zeigten sich nur geringfügige degenerative Veränderungen des medialen Kompartiments im Vergleich zu den präoperativen Voraufnahmen. Nur 2 (10,5 %) von 19 Patienten hatten eine deutliche Gelenkspaltverschmälerung. Dagegen wiesen 10 (50 %) von 20 Patienten der Gruppe B eine erhebliche Verringerung des Gelenkspaltes auf. Dieser Unterschied war sowohl im zeitlichen Verlauf als auch gegenüber den Graduierungen der Gruppe A statistisch signifikant ($p < 0,05$). Patienten (12 von 39) mit einer Gelenkspaltreduktion und Osteophytenbildung hatten signifikant ($p = 0,003$) mehr Kniegelenkschmerzen als die Patienten (27 von 39) mit normalen und fast normalen Befunden.

Tab. 10: Femorotibiale Osteoarthrose des lateralen Kompartments präoperativ und zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung (NU).

	Gruppe A	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe B
	präop	NU	präop	NU
femorotibial lateral				
(A)normal	19	17	19	15
(B) fast normal (> 4 mm)	-	2	1	5
(C) abnormal (2-4 mm)	-	-	-	-
(D) deutlich abnormal (<2 mm)	-	-	-	-

Insgesamt zeigten zur Nachuntersuchung 13 Patienten (33,3 %) erhebliche osteoarthrotische Veränderungen des Kniegelenkes.

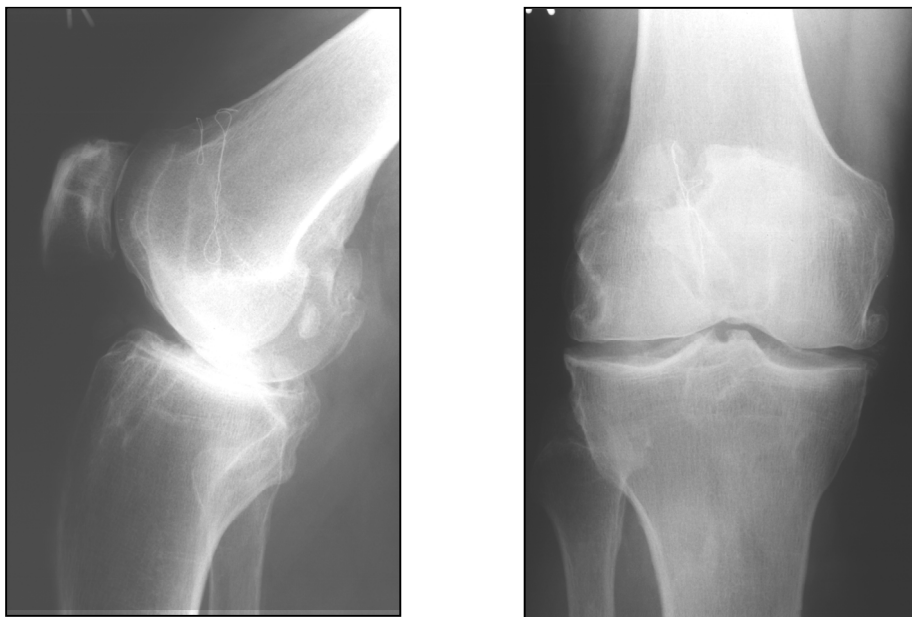


Abb. 12: a, b: Postoperatives Röntgenbild 15 Jahre nach vorderer Kreuzbandplastik. Fehlpositionierung beider Bohrkanaäle, jeweils zu weit ventral. Erhebliche osteoarthrotische Veränderungen in allen Kompartimenten.

Präoperativ betrug der Patellahöhenindex nach BLACKBURN/PEEL (1977) an den Kreuzband verletzten Kniegelenken 0,79 (+/- 0,16) (Gruppe A - 0,78 (+/- 0,12); Gruppe B - 0,81 (+/- 0,11) und postoperativ zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung 0,67 (+/- 0,23) (Gruppe A - 0,70 (+/- 0,14); Gruppe B - 0,66 (+/- 0,11)). Es bestand eine Tendenz

zur Patella baja, dieser Unterschied war aber genau wie die Gruppenunterschiede statistisch nicht signifikant.

Der Interkondylendachwinkel der Patienten beider Untersuchungsgruppen betrug im Mittel 32° ($\pm 5,6^\circ$) mit einem Minimal- und Maximalwert von 24° und 40° .

Die Bestimmung des Zentrums des femoralen Bohrkanals in der Methode nach BERNARD und HERTEL (1996) ergab für die Strecke a (Abstand von der dorsalen Kondylenkante) eine mittlere Distanz bezogen auf die Gesamtlänge der Interkondylärgrube von 43,4 % ($\pm 10,9$ %) (Min.–Max. 24,4 % - 59,2 %). Nur 2 Patienten hatten ihre Bohrkanäle im anatomischen Idealbereich von ~ 25 %. Alle anderen Bohrkanäle waren zu weit ventral positioniert.

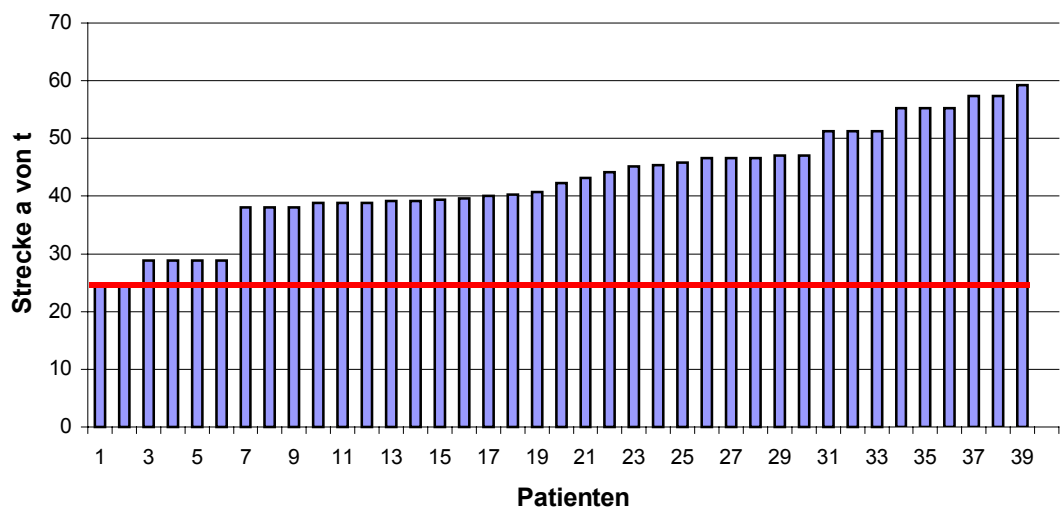


Abb. 13: Lage des femoralen Bohrkanals von der Kondylenhinterkante in Prozent bezogen auf die Gesamtlänge der Interkondylengrube

Der Abstand der Strecke b bezogen auf die Gesamthöhe der Interkondylärgrube ergab im Mittel 20,8 % ($\pm 5,1\%$) (Min.–Max. 12,5 % - 30,4 %). Die Höhe des femoralen Bohrkanals war für 8 Patienten (20,5 %) im empfohlenen Bereich von ~ 25 % nach BERNARD und HERTEL (1996).

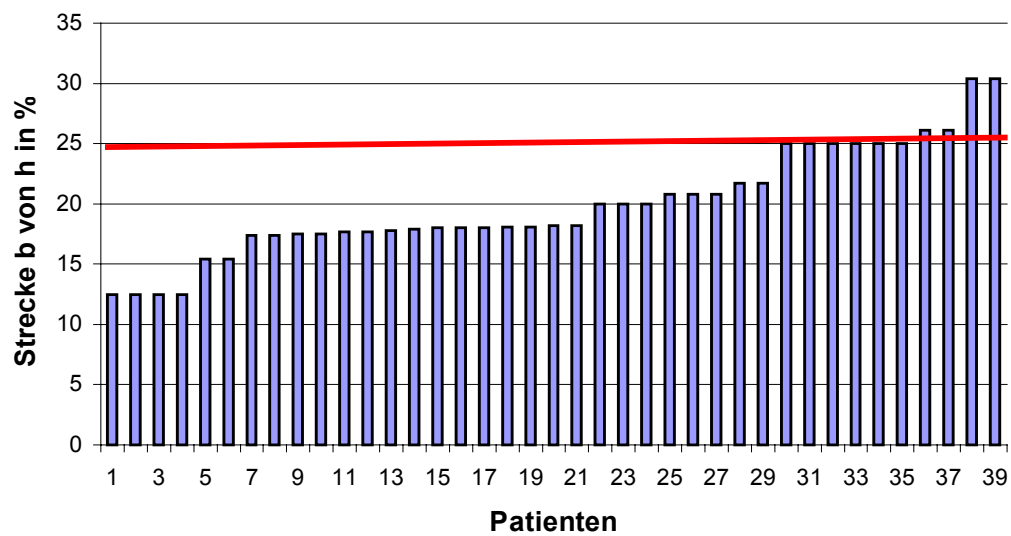


Abb. 14: Lage des femoralen Bohrkanals von der Kondylenoberkante in Prozent bezogen auf die Gesamthöhe der Interkondylengrube

Das Zentrum des tibialen Bohrkanals wurde anhand von seitlichen Röntgenaufnahmen in der Technik nach STÄUBLI und RAUSCHNING (1994) ausgemessen. Der Mittelwert des Bohrkanalzentrums bezogen auf den Sagittaldurchmesser der Tibia lag bei 35,6 % (+/- 8,8 %) (Min. – Max. 25,7 % – 52,8 %).

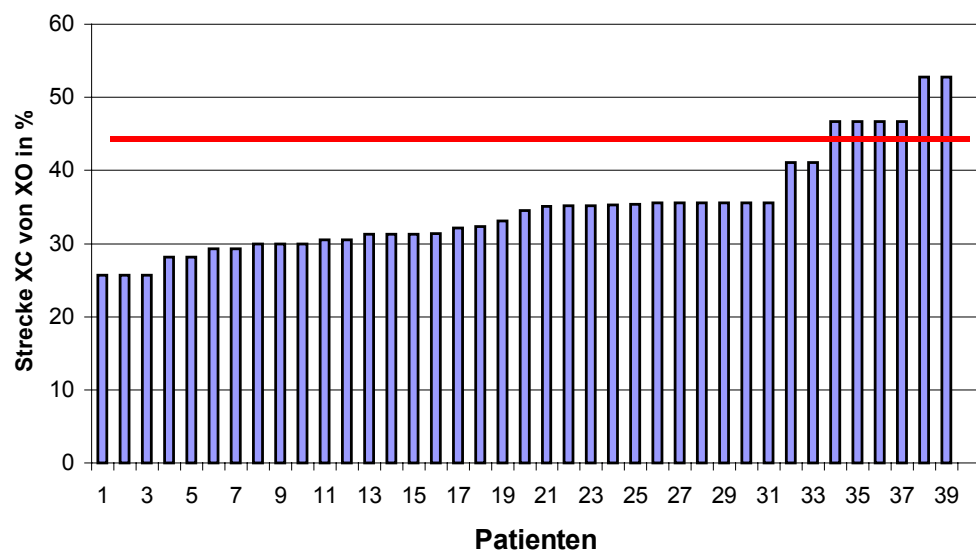


Abb. 15: Lage des tibialen Bohrkanalzentrums (XC) an der Gelenkfläche in Prozent bezogen auf den Sagittaldurchmesser (XO) des proximalen Tibiaplateaus

Die Röntgenanalyse zeigte, dass lediglich 6 Patienten (15,4 %) ihr Bohrkanaalzentrum in der Nähe der anatomischen Insertion von 44 % hatten. Die Mehrzahl der operierten Patienten wiesen eine zu weit ventrale Positionierung des tibialen Bohrkanaals auf.

Der Impingement-Index nach JÄGER (2000) ergab im Mittel einen Wert von 1,09 (+/- 0,26) (Min.-Max. 0,54 – 1,63). Die Einzelanalyse zeigte bei 11 Patienten (28,2%) einen Wert <1, was als Hinweis für ein Transplantatimpingement zu bewerten ist.

Zur Erfassung des Kniegelenkschmerzes und vor allem des vorderen Knieschmerzes nach Transplantatentnahme aus der Patellarsehne wurde eine VAS-Methode eingesetzt. Auf die Frage: *„Wie oft schmerzt Ihr Knie?“* markierten die Patienten auf einer Skala von 100 mm im Mittel 42,4 mm (+/- 24,3 mm). Etwa gleich hoch wurde die Frage: *„Haben Sie Schmerzen beim Treppensteigen“* mit einem Mittelwert von 46,2 mm (+/-30,9 mm) angekreuzt.

Die Frage: *„Schmerzt Ihr Knie im sitzen?“* wurde im Durchschnitt mit 23,6 mm (+/- 22,2 mm) beantwortet. Dagegen wurde für die Frage: *„Haben Sie Schmerzen beim Kniestand?“* mit durchschnittlich 68,1 mm (+/- 20 mm) markiert. Hierbei deckte die gezielte Untersuchung nach dem Geschlecht weitaus höhere Schmerzwerte für die weiblichen Individuen als für die männlichen Individuen auf.

Es lässt sich aus diesen Ergebnissen ablesen, dass der Knieschmerz weitaus ausgeprägter vorhanden ist als er in jedem Nachuntersuchungs-Score aufgezeigt wird. Insbesondere der Kniestand wurde als schmerzhaft von den Patienten angegeben.

Hinsichtlich der subjektiven Einschätzung der Kniegelenksstabilität wurde für die Frage: *„Ist Ihr Knie locker?“* eine mittlere VAS Bewertung von 55,5 mm (+/- 40 mm) angegeben. Die Frage: *„Haben Sie Probleme mit ihrem operierten Kniegelenk bei Drehungen?“* ergab im Mittel 69,1 mm (+/- 32,7 mm). Auch die Frage: *„Haben Sie Probleme beim abrupten Stop oder Richtungswechsel während des Joggens oder Gehens?“* zeigte im Mittel eine Einschätzung von 52 mm (+/- 38,4 mm).

Auch die subjektive Erfassung ausgewählter Fragen zur Stabilität und Funktionalität demaskieren vorhandene Defizite. Die dokumentierten Qualitäten der Patienten auf einen VAS Strahl liegen bei den ausgewählten Fragen jeweils über 50 % der Skalierung. Aus diesen Befunden ist die Bedeutung derartiger sensibler Erfassungsmethoden zu unterstreichen. Sie ermöglichen den Patienten eine Selbsteinschätzung die in ähnlicher Form durch keinen Score dokumentiert werden kann.

2.6 Diskussion der klinischen Resultate

Die vorliegende retrospektive Studie besitzt das längste Nach-untersuchungsintervall, welches jemals nach vorderen Kreuzbandplastiken publiziert wurde. Alle Daten wurden nach anerkannten Kriterien aufgearbeitet und systematisch ausgewertet. Insbesondere um eine Aussage zur langfristigen Entwicklung der Kniegelenkstabilität und der Arthroseentwicklung zu geben, sind Langzeituntersuchungen sehr wertvoll. Die Bedeutung dieser Arbeit liegt nicht nur in der Länge des Nachuntersuchungszeitraumes von durchschnittlich 13,8 Jahren, sondern vor allem auch darin, dass zwei Untersuchungsgruppen verglichen wurden, die einen unterschiedlichen operativen Aufwand hatten.

Nachteilig in dieser Studie ist die Tatsache, dass das Patientenkollektiv recht klein ist und das operative Techniken und Rehabilitationsprogramme angewandt wurden, die heutzutage überholt und durch neue Verfahren und Strategien abgelöst wurden.

Der Vergleich mit den international publizierten Langzeituntersuchungen gestaltet sich schwierig, da keine einheitlichen Evaluierungskriterien eingesetzt wurden. Im Rahmen einer Literaturrecherche des NLM (National Library of Medicine) konnten 20 Langzeituntersuchungen mit einer minimalen Beobachtungszeit von 5 Jahren nach autologen Kreuzbandplastiken gefunden werden. Von diesen 20 Arbeiten erfüllen aber nur 6 Arbeiten die Grundlagen für eine objektive Vergleichbarkeit. Alle diese Publikationen wurden nach 1997 veröffentlicht und enthalten den einzig international anerkannten Nachuntersuchungsbogen (IKDC) für Kniebandoperationen. Alle anderen Arbeiten enthalten nur bruchstückhafte Daten, welche zum Vergleich genutzt werden können. Welche Schwierigkeit für die Vergleichbarkeit von differenten Evaluierungskriterien bestehen wurde bereits 1991 von BOLLEN und SEEDHOM beschrieben.

Obwohl eine festgelegte Empfehlung (HEFTI et al. 1993) für die Inhalte von Nachuntersuchungen existiert, sollte in jedem Fall kritisch hinterfragt werden, ob das ermittelte Gesamtergebn eines Individuums auch die tatsächliche subjektive Zufriedenheit und Leistungsfähigkeit des Patienten nach einer vorderen Kreuzbandoperation widerspiegelt. Es ist durchaus möglich, dass Nachuntersucher etwas messen, was der Patient nicht fühlt und umgekehrt, der Patient etwas fühlt, was ein Nachuntersucher nicht messen kann (LABS und PAUL 1997).

Um der subjektiven Einschätzung des Patienten besser gerecht zu werden hat sich die Nutzung von Visuellen Analog Skalen (VAS) bewährt (FLANDRY et al. 1991, HÖHER et al. 1995). Auch in der eigenen Nachuntersuchung wurde aus diesem Grund zur besseren Einschätzung der Befindlichkeit der Patienten eine VAS-Analyse eingesetzt.

Der Vergleich der ermittelten Resultate im IKDC Evaluationblatt mit denen in der Literatur verdeutlicht, dass die eigenen Ergebnisse ein erheblich schlechteres Outcome für die Kategorie A und B mit 53,9 % im Vergleich zu 77 % AGLIETTI et al. (1997), 76,2 % JOHMA et al. (1999a), 80 % HERTEL et al. (1999), 78,9 % POKAR et al. (2001) und 85,3 % JÄRVELÄ et al. (2001) zeigte. Die eigenen Ergebnisse wurden maßgeblich schlecht durch persistierende Schmerzen und Bewegungseinschränkungen geprägt. Als Ursachen hierfür können die längere Nachuntersuchungszeit mit einem progredienten Arthroseschmerz, die zum damaligen Zeitpunkt angewandte offene Operationstechnik, die signifikante Fehlpositionierung der Bohrkanäle, die Fixierung des Transplantates in einer zu starken Beugestellung des Kniegelenkes und die prolongierte Immobilisation des operierten Gelenkes diskutiert werden. Mit Sicherheit wird das Endergebnis multifaktoriell bestimmt und die Validierung der Einzelfaktoren ist nicht möglich.

15 – 20 Jahre nach einer unversorgten vorderen Kreuzbandverletzung entwickeln 70 % der Patienten eine Arthrose. Dieser Prozess ist mitunter sehr langsam und kann in einigen Fällen in seiner Progression stagnieren (GILLQUIST und MESSNER 1999). Auch nach genähten vorderen Kreuzbandverletzungen wurden leichte bis mittelgradige osteoarthrotische Veränderungen bei 84 % der Patienten nach 20-jährigem Verlauf beobachtet. Bemerkenswert in dieser Studie von MALETIUS und MESSNER (1999) war, dass im Vergleich zu den 12 Jahres Ergebnissen eine Zunahme der Arthroserate von 32 % zu beobachten war.

Nach vorderem Kreuzbandersatz wurde im Mittel 13,8 Jahre nach der Operation bei 33 % der Patienten bedeutsame arthrotische Veränderungen gesehen. Auch in anderen Langzeitstudien nach vorderem Kreuzbandersatz wurde über eine ähnlich hohe Arthroseentwicklung berichtet (JÄGER et al. 2000, JOMHA et al. 1999a, PATEL et al. 2000). In den eigenen Ergebnissen wiesen Patienten mit Gelenkspaltreduktionen und Osteophytenbildung signifikant mehr Kniegelenkschmerzen auf. Diese vermehrte Arthroseentwicklung zeigte einen direkten Zusammenhang zu den durchgeführten Meniskusresektionen.

Die bedeutende Rolle der Menisken in der Kraftübertragung und der Protektion des Gelenkknorpels konnte experimentell (FUKUBAYASHI und KUROSAWA 1980, WALKER und ERKMAN 1975) und in zahlreichen klinischen Studien durch eine hohe Inzidenz radiologischer osteoarthrotischer Veränderungen nach offenen Meniskektomien (FAIRBANK 1948, JOHNSON et al. 1974, JÖRGENSEN et al. 1987, TAPPER und HOOVER 1969) belegt werden.

Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass eine Meniskusrefixation die Entwicklung einer Osteoarthritis langfristig protektiv entgegenwirken kann (JÄGER et al. 2000).

Im Gegensatz hierzu zeigten ROCKBORN und MESSNER (2000) in einer vergleichenden Studie, 7 und 13 Jahre nach offener Meniskusnaht und Meniskektomie, dass nach 7 Jahren die radiologisch messbare Gelenkspaltreduktion in der Meniskektomiegruppe signifikant erhöht war, aber nach 13 Jahren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in der Entwicklung der Osteoarthritis vorhanden waren. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch JÄRVELÄ et al. (2001) in ihrer vergleichenden Studie 5 – 9 Jahre nach vorderem Kreuzbandersatz mit und ohne partieller Meniskusresektion.

Die eigenen Daten konnten diese Aussagen nicht bestätigen, da eine signifikante Zunahme der degenerativen Veränderungen, insbesondere des medialen Kompartiments nach Meniskektomie, festgestellt wurde. Der Einfluss verschiedener Variablen muß in diesem Fall berücksichtigt werden. So war der Zeitpunkt der operativen Stabilisierung in beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. Während es sich in der Gruppe A um akute und frühsekundäre Versorgungen handelte, waren es in der Gruppe B chronische Instabilitäten. Auch das Alter der Gruppen zum Operationszeitpunkt zeigte, dass die Patienten der Gruppe A biologisch signifikant jünger waren. Obwohl radiologisch präoperativ keine signifikanten degenerativen Unterschiede in den Versorgungsgruppen zu objektivieren waren, spricht für die fortgeschrittene intraartikuläre Binnenschädigung der hohe Anteil an sekundären Meniskusschäden, die mit einer erhöhten Knorpelbelastung vergesellschaftet sind. Im Weiteren ist zu berücksichtigen, dass alle Meniskusresektionen in einer offenen Technik durchgeführt wurden, diese sind weitaus aggressiver, insbesondere für Hinterhorn- und Korbhenkelläsionen als arthroskopische Techniken (BERGSTROM et al. 1984, NOTHERMORE-BALL et al. 1983, SIMPSON et al. 1986).

Neben der Resektionstechnik ist auch die Rissform, die Risslokalisation, die Resektionsgröße und das Geschlecht der Patienten von entscheidendem Einfluss auf sekundäre Knorpelschäden und Osteoarthritisentwicklung des Kniegelenkes (ROCKBORN und GILLQUIST 1995, ROOS et al. 2001).

Die Kniegelenkbeweglichkeit der nachuntersuchten Patienten ist als extrem schlecht einzuschätzen. 20,5 % der Patienten hatten Streckdefizite $< 3^\circ$, 66,6 % von 3° - 5° und 12,8 % von 6° - 10° . Beugedefizite wurden $< 5^\circ$ bei 17,9 %, von 6° - 15° bei 51,3 % und von 16° - 25° bei 30,8 % der Patienten gesehen. Sowohl im Standarduntersuchungsbogen der IKDC als auch im Lysholm-Score erzielte das

Kriterium Beweglichkeit die schlechtesten Resultate. Dabei entspricht im IKDC Bogen das schlechteste Ergebnis dem Gesamtergebnis. Im Lysholm-Score erhält das Kriterium Tiefkniebeuge lediglich 5% der möglichen Gesamtpunkte und hat demzufolge nur einen geringfügigen Wert auf das Endresultat.

In der Literatur berichtete AGLIETTI et al. (1997) lediglich über Extensionsdefizite $< 3^\circ$ bei 73 % von 3° - 5° bei 22 % und von 6° - 10° bei 4 % der Patienten. Beugeverluste wurden in einem noch geringeren Umfang beobachtet. Bis $< 5^\circ$ bei 97 % und 6° - 10° bei 3 % seiner Patienten. HERTEL et al. (1999) gab Extensionsverluste $< 3^\circ$ bei 47 % und von 3° - 5° bei 47 % der Patienten in seiner Nachuntersuchung an. Beugeverluste waren ebenfalls zu vernachlässigen mit $< 5^\circ$ bei 80 % und von 6° - 10° bei 13 % der Patienten.

Der Verlust der physiologischen Beweglichkeit hat eine erhebliche Konsequenz für die Funktionalität eines operierten Kniegelenkes. Es resultieren hieraus vor allem statische und muskuläre Fehlbelastungen, die wiederum einen Einfluss auf den chondrosynovialen Stoffwechsel und der sekundären Knorpelschädigung sowie der Arthroseentstehung haben.

Die Ursachen für die ernüchterten Resultate der eigenen Nachuntersuchung sind nicht nur in der prolongierten Rehabilitation zu suchen, sondern vor allem in der Fehlpositionierung des femoralen und tibialen Bohrkanals und der zu starken Beugestellung während der Transplantatfixation zu sehen.

Die zur damaligen Zeit favorisierte postoperative Ruhigstellung im Gipsverband in einer Kniebeugestellung von 20° für 6 Wochen hatte häufig die Folge eines Streckverlustes. Es kam zu einer Verkürzung der Beugemuskulatur und der dorsalen Kapsel. Auch Verwachsungen im vorderen Kompartiment oder die Bildung von Pseudotumoren (JACKSON und SCHAEFER 1991) wurden als Ursache für eine Streckhemmung angeschuldigt. Es folgten langwierige Rehabilitationsproceduren und gegebenenfalls Manipulationen unter Narkose oder Arthrolyseoperationen.

Erst die bahnbrechenden Arbeiten von BURRI et al. (1973, 1974) und SHELBOURNE und NITZ (1990) gaben die wissenschaftliche Grundlage und führten zum Übergang von der frühfunktionellen und später sogar zur aggressiven Rehabilitation.

Die methodisch bedingte vorsichtige Rehabilitation ist nur eine Determinante für postoperative Bewegungseinschränkungen. ASHIMA et al. (1996) und BYLSKI-AUSTROW et al. (1990) konnten in ihren Arbeiten eindeutig zeigen, dass VKB-Transplantate, die in einem zu hohen Flexionswinkel fixiert werden sowohl zur Transplantatschädigung in der Vollstreckung als auch zu einer Strecklimitierung führen können. Alle nachuntersuchten Plastiken wurden in einem Beugewinkel von 30 - 45°

fixiert. Auch hier lag ein weiterer methodischer Fehler vor der entweder zur Transplantatlockerung oder zum Streckverlust geführt hat. Es sei an dieser Stelle bemerkt, dass Lockerungen nicht beobachtet wurden und in diesem Zusammenhang die Extensionsverluste im Vordergrund standen.

Gegenwärtig ist eine Transplantatfixierung in Extensionsnähe allgemein anerkannt und operativer Standard. Lediglich bei Verwendung der All-inside-Technik, die erstmals von MORGAN (1995) beschrieben wurde, muss operationstechnisch bedingt die Fixierung des Transplantates in mindestens 120° Kniebeugung erfolgen.

Ziel jeder vorderen Kreuzbandplastik ist die Wiederherstellung der physiologischen Kinematik und funktionellen Stabilität des Kniegelenkes. Die anatomische Lage der Bohrkanäle hat hierbei den größten Einfluss auf das klinische Resultat.

Die Isometrie ist eine idealisierte Vorstellung von Längengleichheit einzelner Faseranteile während des gesamten Bewegungsumfanges. Nach HEFZY et al. (1989) sowie GRAF und UHR (1988) wird eine Längenänderung von maximal 2 mm im gesamten Mobilisationsbereich als funktionelle Isometrie definiert. Der Verlauf der Fasern des vorderen Kreuzbandes ist jedoch nicht isometrisch, es besteht ein Querlockerungsmuster der Faseranteile im Bewegungsablauf des Kniegelenkes, wobei das posterolaterale Bündel eine deutlich stärkere Lockerungsbewegung als das anteromediale Bündel aufweist.

Aus funktioneller Sicht wird bei der plastischen VKB-Versorgung das anteromediale Bündel rekonstruiert. In Extensionsnähe sind die Fasern vor allem in Innenrotationsstellung am stärksten angespannt (HERTEL 1989).

Der Begriff der Isometrie wird heutzutage kaum noch verwendet, da er nicht dem realisierbaren Ziel einer Rekonstruktion entspricht. Isometriemessungen zeigten eine schlechte Korrelation mit den Spannungen im Transplantat in Kadaverstudien (FLEMING et al. 1993, MORGAN et al. 1995) und in in-vivo Studien (FLEMING et al. 1994).

Die Annäherung an die Wirklichkeit kann nur durch eine Kompromisslösung umgesetzt werden und hierfür haben sich die Begriffe anatomisch oder anatomometrisch bewährt (AMIS und JACOB 1998). Das Auffinden der entsprechend adäquaten Bohrkanäle bereitete in der Vergangenheit große Schwierigkeiten und das Vorstellungsvermögen von der idealen Lokalisation divergierte stark (KOHN et al. 1998).

Auch die Einführung von Zielgeräten mit recht unterschiedlichem Design konnte die hohe Fehlplatzierungsrate nicht verringern. Jedes Zielgerät in der Hand eines Operateurs ist nur so gut wie es eingesetzt wurde. Auch die Einführung von arthroskopischen Techniken und der transtibialen femoralen Bohrkanalanlage führte zu zahlreichen Fehlplatzierungen (HOWELL et al. 1999). Die Folgen einer nicht anatomometrischen Platzierung sind

Transplantatlockerung, Notch- oder Wallimpingement, Überspannung (overconstraint) des Transplantates mit Transplantatschädigung, Bewegungseinschränkungen und schließlich eine Zunahme der Revisionseingriffe (HOWELL 1998).

Verschiedene Studien zeigten, dass ein weit hinten liegender femoraler Bohrkanal, mit seinem Bohrkanalzentrums 4-5 mm vor der over the top Position, die geringsten Längenänderungen des Transplantates während der Vollstreckung besitzt (BRADLEY et al. 1988, HEFZY et al. 1989, HOOGLAND und HILLEN 1984, SAPEGA et al. 1990).

Die Lage des tibialen Bohrkanals wurde in der Vergangenheit durch die Chirurgen unterschätzt. Zum einen haben experimentelle Untersuchungen gezeigt, dass die Tolerabilitätsgrenzen für Transplantatlängenänderungen weitaus größer sind als femoral (SAPEGA et al. 1990) und zum anderen gelingt eine direkte Visualisierung der Kontaktzone zwischen dem Transplantat und dem Dach der Fossa intercondylica während der Operation nicht (HOWELL 1998). Erst extensive radiologische Untersuchungen deckten die große Variabilität des Kondylendachwinkels im Bereich von 23-60° auf (AMIS und JACOB 1998, HOWELL und BARAD 1995, SCUDERI 1993). Ein Transplantat sollte direkt parallel zum Verlauf des Interkondylendaches in maximaler Kniegelenkextension liegen. Der Winkel des Interkondylendaches und die Lage des tibialen Bohrkanals haben somit maßgeblichen Einfluss, ob ein Transplantat den Knochen berührt (Roofimpingement) und dadurch potentiell geschädigt wird. Die Bezeichnungen „unforgiving“ und „forgiving“ Kniegelenk können genutzt werden um zu beschreiben, wie die Lage des tibialen Tunnels ein Transplantat in Abhängigkeit des Interkondylendachwinkels affektiert.

Die radiologische Evaluierung der Bohrkanallage zeigte beeindruckend die hohe Rate an Fehlplatzierungen. Insgesamt nur 2 von 39 Patienten hatte eine ideale Lage in der Graduierung nach BERNAD und HERTEL (1996). Wenn die Toleranzgrenze auf des Bohrkanalzentrums auf 30 % von der dorsalen Kante der Interkondylärgrube erhöht wird, heißt dies, dass 85 % der femoralen Bohrkanäle zu weit ventral angelegt wurden. Eine ähnliche hohe Fehlplatzierung wurde für die Lage des tibialen Bohrkanals beobachtet. In Anlehnung an die Berechnungen von STÄUBLI und RAUSCHNING (1994) erreichten nur 6 Patienten (15,4 %) die anatomisch ideale Position. Auch der Impingement-Index nach JÄGER (2000) korrelierte mit dem Extensionsverlust.

Für die mitunter nicht immer einfache Ausmessung der Bohrkanallagen stehen inzwischen zahlreiche Empfehlungen und Methoden sowohl femoral (AGLIETTI et al. 1995, AMIS et al. 1994, BERNAD und HERTEL 1996, HARNER et al. 1994, SOMMER et al. 2000) als auch tibial (HOWELL und CLARK 1992, KHALFAYAN et al. 1996, LINTNER et al. 1996, STÄUBLI und RAUSCHNING 1994) zur Verfügung.

Hinsichtlich der metrischen Angaben divergieren die empfohlenen Daten lediglich in Hinblick auf die Bezugsgröße der eingesetzten Methode. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit ist eine hohe Röntgenqualität mit einer standardisierten streng seitlichen Projektionsebene. KLOS et al. (2000) zeigte in seiner radiologischen Untersuchung, dass insbesondere die femorale Bohrkanalbestimmung in der Messmethode nach AMIS et al. (1994) bei suboptimaler Röntgenprojektion die geringsten Messfehler aufwies.

Die ermittelten Stabilitätswerte sowohl für die KT-1000 Messung als auch die dynamische Untersuchung des pivot shift Tests waren für die nachuntersuchten Patienten als sehr gut einzuschätzen. Insgesamt 33 % der Patienten lagen im manuell maximum Test in der Seitendifferenz unter 2mm und 66 % im Bereich zwischen 3-5 mm. Im Vergleich mit der Literatur liegen diese Werte nur geringfügig unter denen von GRONTVEDT et al. (1996), SHELBOURNE und STUBE (1997), HERTEL et al. (1999) angegebenen.

Die erreichten Stabilitätswerte werden erheblich relativiert wenn man gleichzeitig die stark eingeschränkte Beweglichkeit der Kniegelenke betrachtet. Letztlich sollte kein Stabilitätsgewinn nach vorderer Kreuzbandrekonstruktion auf Kosten der Beweglichkeit resultieren.

Die subjektive funktionelle Patientenselbsteinschätzung erreichte im IKDC Standarduntersuchungsbogen für 27 Patienten (69,5 %) ein normales oder fast normales Resultat. Ein noch besseres Resultat war überraschenderweise in der zusammenfassenden Symptomeinschätzung (Knieschmerz unter Aktivität, Knieschwellung, giving-way) ermittelt worden, denn 29 Patienten (74,4 %) erreichten die Kategorie A und B. Bei genaueren Hinterfragen wurde aber spontan von vielen Patienten ein retropatellärer Knieschmerz angegeben.

Die radiologische Auswertung des Patellahöhenindex nach BLACKBURN und PEEL (1977) zeigte tendenziell eine Zunahme des Patellatiefstandes, dieser war allerdings nicht signifikant. Auch die Veränderungen des Femoro-patellargelenkes zeigten keine signifikanten Zunahmen der degenerativen Veränderungen zum Nachuntersuchungszeitpunkt. Aber alle Patienten hatten bei der klinischen Untersuchung ein retropatelläres Krepitieren und 21 Patienten (53,8 %) hatten ein störendes Taubheitsgefühl im vorderen Kniebereich.

Zahlreiche, für den Patienten im ersten Moment nicht relevante Faktoren werden allerdings aufgrund der Kürze der Fragen und den geringen Antwortoptionen im IKDC-Standarduntersuchungsblatt nicht berücksichtigt. Als äußerst nützlich hat sich hierfür die Ergänzung der VAS-Methode zur Demaskierung von Defiziten gezeigt. Die Vorteile

eines VAS-Fragebogen liegen nach HÖHER et al. (1995) in der zeitsparenden und universellen Anwendbarkeit bei unterschiedlichen Kniebinnenschädigungen und seiner Untersucherunabhängigkeit. Allerdings wird der visuellen analog Skala eine Tendenz zur Bewertung im zentralen Drittelbereich vorgeworfen (KELLER et al. 1993). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Nimmt man die Frage: „*Wie oft schmerzt Ihr Knie?*“ so zeigte der Mittelwert 42,4 mm. Gleiches gilt für die Frage: „*Haben Sie Schmerzen beim Treppensteigen*“ mit 46,2 mm. Aber die Frage: „*Haben Sie Schmerzen beim Kniestand?*“ zeigte mit im Mittel 68,1 mm eine deutlich höhere Schmerzbewertung. Zusätzlich ließen sich eindeutige Geschlechtsunterschiede herausarbeiten. Insbesondere Frauen mit einer geringen subkutanen Fettschicht und Tätigkeiten mit Bodenkontakt (z.B. Kindergärtnerin) beklagten einen erheblichen vorderen Knieschmerz.

Das Problem der Entnahmemorbidität nach Kreuzbandplastik mit dem Patellarsehnentransplantat wird recht kontrovers diskutiert. Die Literaturangaben über persistierende Schmerzen im Bereich der Entnahmestelle liegen zwischen 19-60 % (MARDER et al. 1991, POVACZ et al. 1997, SACHS et al. 1989, SHAEFER und TIBONE 1993).

Die Ursache des vorderen Knieschmerzes ist wahrscheinlich multifaktoriell. Gegen die Annahme, dass die Transplantatentnahme alleine oder hauptsächlich für die Entwicklung vorderer Knieschmerzen verantwortlich ist, spricht, dass auch nach Verwendung von Allografts (NOYES und BARBER-WESTIN 1996, ROBERTS et al. 1991), von Semitendinosus-/Gracilissehnen (MARDER et al. 1991) oder bei Transplantatentnahmen von der Gegenseite (BRÜCK et al. 1998, RUBENSTEIN et al. 1994) Beschwerden beschrieben wurden, die nicht auf die Gewinnung der Patellarsehne zurückzuführen sind.

2.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen der Langzeit-nachuntersuchung folgende Aussagen ableiten. Die Ergebnisse sind im Vergleich mit anderen klinischen Langzeitstudien deutlich schlechter. Hauptursachen hierfür sind operativ-technische Fehler, wie Fehlpositionierung der Bohrkanäle und die Fixierung der Transplantate in einer zu hohen Kniebeugestellung. Die Folge waren signifikant schlechte Bewegungsausmaße sowohl in der Streckung als auch in der Beugung. Insbesondere bei zu weit ventral positionierter femoraler Bohrkanalanlage resultierte ein erhebliches Beugedefizit mit Stressbelastung auf das femorotibiale Kompartiment, ähnlich einem Nußknackerphänomen. Bei zu weit ventral positioniertem tibialen Bohrkanal wurde eine signifikante Verringerung der Extension beobachtet. Der Impingement-Index nach JÄGER (2000) erwies sich als valider Parameter zur Vorhersage eines Streckdefizits. Der Gruppenvergleich konnte eindeutig eine erhöhte Arthroseentwicklung nach Meniskusresektionen belegen. Eine frühe vordere Kreuzbandrekonstruktion erscheint zur Protektion weiterer Kniebinnenschäden (Meniskus, Knorpel) der Rekonstruktion einer chronischen Kniegelenkinstabilität überlegen. Auch wenn messbare radiologische Veränderungen des Femoropatellargelenkes nicht nachzuweisen waren, zeigte die VAS-Methode einen hohen Anteil an vorderen Knieschmerz nach einer mittleren Nachuntersuchungszeit von 13,8 Jahren. Hierbei lag eine eindeutige Geschlechtsspezifität vor. Die wiedererlangte Gelenkstabilität wird durch persistierende Schmerzen und den hochgradigen Bewegungsverlust als nicht gewinnbringend eingeschätzt. Sowohl die zum damaligen Zeitpunkt allgemein anerkannte Operationstechnik als auch die postoperative Rehabilitation ist zeitlich überholt und entspricht nicht den gegenwärtigen internationalen Standards.

2.8 Klinische Schlussfolgerungen

Die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes sollte mit einem zeitgemäßen minimierten Verfahren (Mini-open, arthroskopisch) erfolgen.

Eine frühsekundäre Versorgung ist der spätsekundären Operation zum Schutz der Kniebinnenstrukturen und zum Erhalt der Reserve-stabilisatoren vorzuziehen.

- Wenn immer es möglich ist, sollte eine meniskuserhaltende Chirurgie angestrebt und mit etablierten all-inside Techniken oder Hybridverfahren (Implantat und Naht) versorgt werden.
- Achsfehlstellungen müssen beachtet und gegebenenfalls mitkorrigiert werden.
- Die Lage der Bohrkanäle muss mit entsprechenden bildgebenden Verfahren unter Beachtung individueller Besonderheiten (Kondylendach-winkel, Kniegelenkhyperextension) geplant und intraoperativ umgesetzt werden.
- Für die intraoperative Kontrolle kann derzeit eine Bildwandlerkontrolle als Standard betrachtet werden, es wird aber in Zukunft durch die Entwicklung der computer-assistierten Chirurgie zu erweiterten Möglichkeiten kommen.
- Vordere Kreuzbandtransplantate sind in Extensionsnähe und mit definierter Vorlast entsprechend der Steifigkeit des Konstruktes zu fixieren.
- Eine frühfunktionelle Nachbehandlung sollte stadiengerecht und an biologische Umbauvorgänge sich orientieren und ist längeren Immobilisationszeiten vorzuziehen.
- Die Frage ob eine Orthese eingesetzt werden soll, ist eine philosophische und kann nur durch den Operateur entschieden werden.

3. Wissenschaftliche Fragestellung

Während sich in der Vergangenheit die Problematik der vorderen Kreuzband-chirurgie vor allem auf operationstechnische, biomechanische und rehabilitative Probleme konzentrierte, stehen seit Mitte der 80er Jahre biologische Fragestellungen des Transplantatumbaus und der knöchernen Einheilung im Mittelpunkt der Grundlagenforschung.

Die klinischen Daten sowohl von mittel- als langfristigen Nachuntersuchung-en nach vorderer Kreuzbandchirurgie sind auch nach Verbesserung von Methoden und Techniken als nicht durchgreifend überzeugend einzuschätzen. Der Umbauprozess einer Bandplastik ist langwierig und mit strukturellen Schwächungen der Transplantate verbunden.

Insbesondere der hohe Anspruch des sportlich aktiven jungen Menschen an die schnelle Wiederherstellung der funktionellen Leistungsfähigkeit ist Verpflichtung genug, Mechanismen der Bandheilung zu untersuchen und durch Einsatz von supportiven Maßnahmen die Umbau- und Reparaturphasen zu verbessern.

Aus den bekannten Phänomenen des kaskadenförmigen Transplantatumbaus nach einer vorderen Kreuzbandplastik und der Tatsache, dass am Ende dieses Umwandlungsprozesses ein hochorganisiertes Narbengewebe mit verringerter mechanischer Festigkeit entsteht, stellt sich die Frage, ob in den Prozess des Transplantatumbaus manipulativ eingegriffen werden kann.

Als tierexperimenteller Ansatz sollte zum einen die Wirkung eines aus der Wund- und Knochenheilung bekannten, fibrinstabilisierenden Faktors (Faktor XIII) und zum anderen eine veränderte Transplantataufbereitung auf die Wirkung der Bandheilung untersucht werden.

4. Experimentelle Grundlagen

4.1 Mikrostrukturierung des Sehnen- und Bandapparates

Der Querschnitt eines Bandes und einer Sehne zeichnet sich durch eine strenge hierarchische Ordnung einzelner Anteile aus. Die umfangreichste Beschreibung der Mikrostruktur des vorderen Kreuzbandes steht seit der Publikation von DANYLCHUK et al. (1978) zur Verfügung.

Als kleinste strukturelle Elemente mit einem Durchmesser von 20 – 200 nm gelten die Fibrillen. Eine Gruppierung von Fibrillen wird als Faser mit einem Durchmesser von 10 – 20 µm bezeichnet. Mehrere Fasern bilden die subfaszikulären Einheiten, welche auch als Primärfaszikel betrachtet werden. Die Primärfaszikel werden durch lockeres endoligamentäres Gewebe (Endotendineum) vom Sekundärfaszikel abgegrenzt. Blutgefäße, Fettzellen und Elastin werden hauptsächlich im lockeren endoligamentären Gewebe gefunden (YAHIA und DROUIN 1989). Insgesamt bilden 3 - 20 dieser Primärfaszikel den Sekundärfaszikel, welcher einen Durchmesser von rund 1mm aufweist und von Peritendineum umgeben ist.

Das vordere Kreuzband besteht aus etwa 20 Milliarden Kollagenfibrillen, die ca. 1500 Kollagenfaszikel bilden (HAUS und REFIOR 1988). Die äußeren Hüllen werden durch das Paratenon bzw. synoviale Hüllgewebe gebildet.

Das vordere Kreuzband besitzt, verglichen mit dem hinteren Kreuzband, hinsichtlich der Kollagenfibrillenanzordnung eine wesentlich komplexere Struktur mit lichtmikroskopisch sichtbaren Verzweigungen und Verflechtungen der einzelnen Faserbündel, womit eine bessere Anpassung an die physiologische Rotationsbelastung sowie die auftretenden Scherkräfte ermöglicht wird (NEURATH und STOFFT 1991).

Der Faszikelverlauf stellt sich in polarisationsmikroskopischen Untersuchungen als periodisch dar. Für das vordere Kreuzband ist dieser wellenförmige Verlauf deutlicher ausgeprägt als für die Patellarsehne. Diese Wellenform wird auch als "crimping" bezeichnet. Für das vordere Kreuzband des Kaninchens wurde eine mittlere Periodizität dieses Wellenmusters von 31,3 µm (+/- 4,3) mit einer maximalen Amplitude von 4,0 µm (+/- 1,3) beschrieben (MURAO et al. 1997).

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen von YAHIA und DROUIN (1989) ergaben zwei unterschiedliche architektonische Muster der Faszikelwellen. In Abhängigkeit von der Lokalisation der Kollagenfibrillen zur Faszikelachse werden planare und helikale Wellenmuster unterschieden. Vergleichende Untersuchungen zwischen dem vorderen Kreuzband und der Patellarsehne zeigten, dass innerhalb eines Faszikels die Fältelung der

Fibrillen von außen nach innen abnimmt. Für das vordere Kreuzband wurden für zentrale Faszikel vor allem planare und für periphere Faszikel hauptsächlich helikale Wellenmuster beschrieben. Dagegen zeigte die Patellarsehne in allen Faszikeln lediglich helikale Formen. In der Patellarsehne sind die Faszikel gleichmäßiger über die Querschnittsfläche verteilt und entlang der Sehnenachse orientiert. Alle Querschnitte zeigen die deutliche Dominanz der extrazellulären Matrix (MOHR 1987).

Den Hauptanteil der zellulären Bestandteile von Sehnen- und Bandgewebe stellen Fibrozyten dar. Die Zellen liegen innerhalb der Kollagenfaszikel aufgereiht, wobei ihre flügelartigen Fortsätze in das parazelluläre Kollagen auslaufen. Die aktivierte Form, der Fibroblast, spielt eine entscheidende Rolle in der Synthese der Grundsubstanz und der Faserproteine. Fibroblasten und Fibrozyten unterscheiden sich in ihrem Stoffwechsel. Während die Fibroblasten vorwiegend ihre Energie über die aerobe Glykolyse gewinnen, dominiert in den Fibrozyten die anaerobe Glykolyse (FLORIDI et al. 1981, LANDI et al. 1980).

4.2 Biochemische Charakteristik des Sehnen- und Bandapparates

Die extrazelluläre Matrix setzt sich neben Wasser hauptsächlich aus Kollagen, das etwa 30 % des Gesamtproteingehaltes im menschlichen Körper repräsentiert, sowie den in unterschiedlicher Quantität vorkommenden elastischen Fasern und Retikulinfasern, Proteoglykanen beziehungsweise Glykosaminoglykanen zusammen. Zahlreiche extrazelluläre Matrixproteine wie Fibrin, Fibronectin, Fibromodulin, Tenascin, Laminin, Enaktin, Decorin, Biglycan, Lumican, Vesican, Syndecan, und verschiedene Metalloproteinasen (BOYKIW et al. 1998, HELLIO LE GRAVERRAND et al. 2000, LO et al. 1998, NEURATH und STOFFT 1992, PLAAS et al. 2000) beeinflussen die Heilung und Reifung von Bindegeweben und sind in jüngster Zeit beschrieben worden. Es ist abzuwarten, welchen Stellenwert diese Proteine in Zukunft im Bindegewebsstoffwechsel beziehen werden.

Die wesentlichste Eigenschaft des Kollagens als Strukturbildner ist seine Fähigkeit zur Aggregation, dadurch entstehen Fibrillen, die sich ihrerseits zu Fasern zusammenlagern. Die genetisch determinierte Sequenz der Aminosäuren in den Polypeptidketten bestimmt die Fäktelung der Ketten in die dreidimensionale Formation. Gegenwärtig sind 20 Kollagentypen bekannt (LISTRAT et al. 1998), die sich in der Aminosäuresequenz ihrer alpha-Ketten unterscheiden. In den nachfolgenden Untersuchungen werden die in Sehnen und Bändern prozentual am häufigsten vorkommenden Kollagen-Typen I und III betrachtet.

Für Sehnen und Bänder gibt es charakteristische biochemische Merkmale des Gesamtkollagengehaltes, der Kollagentypisierung und des Quervernetzungsmusters (AMIEL et al. 1986b, RIECHERT 2001).

Die in der Literatur beschriebenen Vergleichswerte sind in den Tabellen 11-13 dargestellt. Hierbei konnten lediglich die biochemischen Merkmale für die Patellarsehne und des genuinen vorderen Kreuzbandes berücksichtigt werden. Für Patellarsehnenkreuzbandtransplantate sind diese Daten in nicht entsprechenden Umfang vorhanden.

Tab. 11: Literaturvergleich der Konzentrationen von Hydroxyprolin bzw. Gesamtkollagen in der Patellarsehne (PS) und dem vorderen Kreuzband (VKB)

Material	Hydroxyprolingehalt	Gesamtkollagengehalt	Modell	Quelle
PS	13,49 – 17,76 mg	85,8 – 87,6 %	Kaninchen	Amiel et al. (1984)
			Kaninchen	Amiel et al. (1982)
	1,88-3,34 g HYP/100 g TG	96,1 %	Mensch	Fujii et al. (1994)
			Mensch	Lemley et al. (1991)
VKB		79,2 - 81,2 %	Kaninchen	Amiel et al. (1984)
		80,6 %	Kaninchen	Ishizue et al. (1990)
		83 %	Mensch	Fujii et al. (1994)
		856 mg/g TG	Mensch	Lane et al. (1993)

Die Funktion von Quervernetzungen der Fibrillen besteht darin, die Kollagenfasern stabil und gegenüber mechanischer Beanspruchung resistent zu gestalten sowie ihnen eine gewisse Viskoelastizität zu verleihen (KÜHN 1974, ROBINS und BAILEY 1977).

Zwei Hauptvertreter der 3-Hydroxypyridinium-Crosslinks, die reife, nicht-reduzierbare stabile Quervernetzungen darstellen, wurden identifiziert. Es handelt sich dabei um Hydroxylysinpyridinolin (HP) bzw. Pyridinolin (PYR) und um das seltener auftretende Lysinpyridinolin (LP) bzw. Deoxypyridinolin (DPD), das aus zwei Hydroxylysinresten- und einem Lysinrest aufgebaut ist. Sie werden als trifunktionale Quervernetzungen bezeichnet, da sie drei benachbarte Kollagenmoleküle verbinden (EYRE et al. 1984a).

Die komplexen Mechanismen der Bildung und Regulierung der einzelnen Schritte der Kollagenbiosynthese, insbesondere der Bildung der nichtreduzierbaren Quervernetzungen, sind bis heute jedoch nur zum Teil aufgeklärt.

Tab. 12: Literaturvergleich der Konzentrationen von Pyridinolin (PYR) und Deoxypyridinolin (DPD) für die Patellarsehne (PS) und das vordere Kreuzband (VKB). (HYP = Hydroxyprolin)

Material	Pyridinolin (mol/mol Koll.)	Deoxypyridinolin (mol/mol Koll.)	Modell	Quelle
PS	0,065	Keine Analyse	Kaninchen	Harwood und Amiel (1992)
	0,44	0,03	Mensch	Eyre et al. (1984b)
	0,4	nicht nachweisbar	Mensch	Fujii et al. (1994)
	5,92 – 8,49 nM/mg HYP	keine Analyse	Rind	Ng et al. (1996)
VKB	0,325	Keine Analyse	Kaninchen	Harwood und Amiel (1992)
	0,67	0,026	Mensch	Fujii et al. (1994)
	7,23 – 9,8 nM/mg HYP	keine Analyse	Rind	Ng et al. (1996)

Die Tabelle 13 gibt eine Übersicht über einige in der Literatur angegebene Ergebnisse für die Kollagentypisierung der Patellarsehne und des vorderen Kreuzbandes. Es wurden unterschiedliche, meist jedoch chromatographische Verfahren mit vielfältigen Modifikationen verwendet. Dementsprechend existieren relativ wenig Standardwerte für die Verteilung der Kollagen Typen I und III.

Tab. 13: Literaturvergleich der Konzentrationen von Kollagen-Typ I und III für die Patellarsehne (PS) und das vordere Kreuzband (VKB)

Material	Koll.-Typ I (%)	Koll.-Typ III (%)	Modell	Quelle
PS	> 95	< 5	Kaninchen	Amiel et al. (1984)
	> 95	0	Kaninchen	Amiel et al. (1986)
	ca. 100	0	Mensch	Fujii et al. (1994)
	keine Analyse	4,51-7,24	Rind	Ng et al. (1996)
VKB	86-90	10-14	Kaninchen	Amiel et al. (1984)
	86-89	11-14	Kaninchen	Amiel et al. (1986)
	ca. 100	0	Mensch	Fujii et al. (1994)
	keine Analyse	6,08-7,63	Rind	Ng et al. (1996)

4.3 Fibrinstabilisierender Faktor XIII

4.3.1 Biochemische Charakteristika

Der Faktor XIII ist als letzter Gerinnungsfaktor entdeckt worden. Obwohl er bereits 1948 von LAKI und LÓRÁND beschrieben wurde, kam der Faktor XIII erst 1960 durch einen Bericht von DUCKERT et al. (1960) in das Bewusstsein der klinisch tätigen Hämostaseologen. Diese Arbeitsgruppe erkannte, dass der Faktor XIII neben seiner hämostatischen Funktion auch Bedeutung im Wundheilungsprozess hat.

Beim Faktor XIII handelt es sich im Gegensatz zu den meisten Gerinnungsproteinen nicht um eine Serinprotease, sondern um eine Transamidase, die in der Lage ist, inter- und intramolekulare Amidbindungen zwischen den Aminosäuren Lysin und Glutamin zu knüpfen.

Der Faktor XIII zirkuliert im Plasma als ein heterotetramerer Komplex aus je zwei a- und b-Untereinheiten, der in dieser Form keine enzymatische Aktivität aufweist.

Die a-Untereinheit besteht aus 731 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 83150 Da und weist zwei Thrombinspaltungsstellen auf. Die erste, die an Position Arg37-Lys38 lokalisiert ist, führt zur Abspaltung eines Peptids und ist für die Aktivierung des Faktor XIII im Blut unter physiologischen Bedingungen notwendig. Durch Spaltung an der zweiten Thrombinbindungsstelle wird das Enzym inaktiviert. Das Gen für Faktor XIII a-Kette besteht aus 14 Exons und ist auf Chromosom 6p24-25 lokalisiert (OSTERMANN 1999).

Faktor XIIIa weist Homologien zu anderen Transglutaminasen sowohl von Vertebraten als auch von Nichtvertebraten auf (AESCHLIMANN und PAULSSON 1994).

Die b-Untereinheit zirkuliert im Plasma als Dimer in einer nichtkovalenten Bindung mit der a-Untereinheit. Sie ist das Transportprotein der a-Kette im Plasma, besteht aus 641 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 73180 Da. Die Faktor XIII b-Untereinheit ist charakterisiert durch 20 Disulfidbrücken, die zu 10 Tandemstrukturen führen. Das Gen für die b-Untereinheit ist auf dem Chromosom 1q32 lokalisiert.

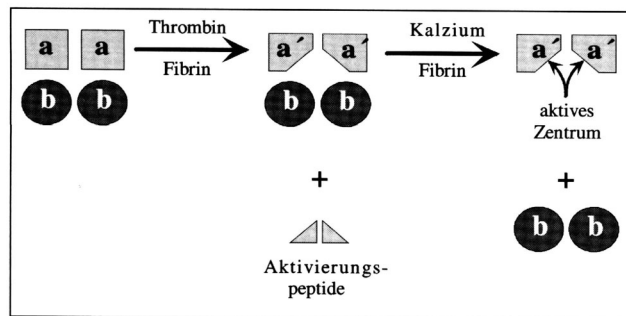


Abb. 16: Faktor XIII-Aktivierungsmechanismus (aus OSTERMANN 1999)

Modelle der dreidimensionalen Struktur des Faktor XIII gehen bei der a-Untereinheit von einer etwas asymmetrischen Kugelform aus, während die b-Untereinheit langgestreckt und flexibel erscheint (OSTERMANN 1999).

Zwar kann die Faktor XIII a-Untereinheit in vielen Geweben und Zellen nachgewiesen werden (hämatopoetische Zellen, Thrombozyten, Monozyten/ Makrophagen, Plazenta, Prostata) jedoch ist die Herkunft der Plasma-Faktor XIII a-Untereinheit nicht endgültig geklärt.

Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Patienten haben gezeigt, dass nach der Transplantation bei vorhandenem Chimärismus der Faktor XIII-Phänotyp des Knochenmarkspenders nachweisbar ist. Dies lässt darauf schließen, dass hämatopoetische Zellen zumindest zu einem Teil als Quelle des Plasma-Faktor XIII a-Untereinheit angesehen werden kann.

Der intrazelluläre Faktor XIII, z.B. in Thrombozyten oder Monozyten, besteht lediglich aus a-Dimeren (LÓRÁND et al. 1980).

In Thrombozyten liegt die a-Untereinheit im Zytoplasma gelöst vor, die Freisetzung während der Aktivierung der Thrombozyten findet nicht statt. Auch in Monozyten lässt sich Faktor XIIIa im Zytoplasma nachweisen. Darüber hinaus ist er in diesen Zellen membranständig, wird allerdings ebenfalls nicht sezerniert. Ob Hepatozyten von wesentlicher Bedeutung für die Produktion des Plasma-Faktor XIIIa sind, erscheint unwahrscheinlich, da Faktor XIII, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Ausmaß in Hepatozyten nachweisbar ist.

Demgegenüber wird als Syntheseort der b-Untereinheit des Faktor XIII die Leber angesehen. Hepatozyten in Kultur sind in der Lage, die Faktor XIII b-Untereinheit zu synthetisieren und lebertransplantierte Patienten weisen den Phänotyp des Spenders auf. Der Gehalt der b-Untereinheit bestimmt die Aktivität des Faktor XIII durch seine Transportfunktion.

4.3.2 Funktion und Wirkung

Zur Aktivierung des Plasma-Faktors XIII ist neben einer proteolytischen Spaltung durch Thrombin auch die Anwesenheit von Kalzium und Fibrin bzw. Fibrinogen notwendig (LÓRÁND 1986, MOSESSON 1998). Die Aktivierung des Faktors XIII beginnt mit der Abspaltung des Aktivierungspeptids durch Thrombin. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit von Fibrin beschleunigt, so dass Fibrin nicht nur Substrat, sondern auch Kofaktor für die Aktivierung des Faktor XIII ist. Durch Kalzium dissoziiert das aus 2a- und 2b-Untereinheiten bestehende inaktive Tetramer zum aktiven Enzym. Die wesentliche Aufgabe der Faktor XIIIb-Untereinheit wird in der Stabilisierung und Verlängerung der Halbwertszeiten der Faktor XIIIa-Untereinheit durch die Bildung des Heterotetramers angesehen.

Hauptsubstrat für Faktor XIII ist das nichtkovalent polymerisierte Fibringerinnsel, das durch die Aktion von Faktor XIII quervernetzt wird. Durch die Quervernetzung gewinnt das Fibringerinnsel an Stabilität und Elastizität. Neben Fibrin stellen Fibrinolyseinhibitoren wie Plasminogenaktivatorinhibitor und alpha-Plasmininhibitor weitere Substrate des Faktor XIII dar, die durch Inhibition der reaktiven Fibrinolyse der zusätzlichen Stabilisierung des Fibringerinnsels dienen.

Ein Fibringerinnsel bildet sich in adäquater Weise in enger räumlicher Nähe zu einer Gewebeläsion. Dabei werden Strukturen der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Fibronectin freigesetzt. Die Quervernetzung von Kollagen und Fibronectin mit Fibrin, die durch Faktor XIII katalysiert wird, dient nicht nur der Anheftung des Fibringerinnsels an die Ränder der Gewebeläsion, sondern ist auch für die Bindegewebsheilung von Bedeutung, da eine optimale Reorganisation der zellulären und extrazellulären Matrix von erheblicher Wichtigkeit ist.

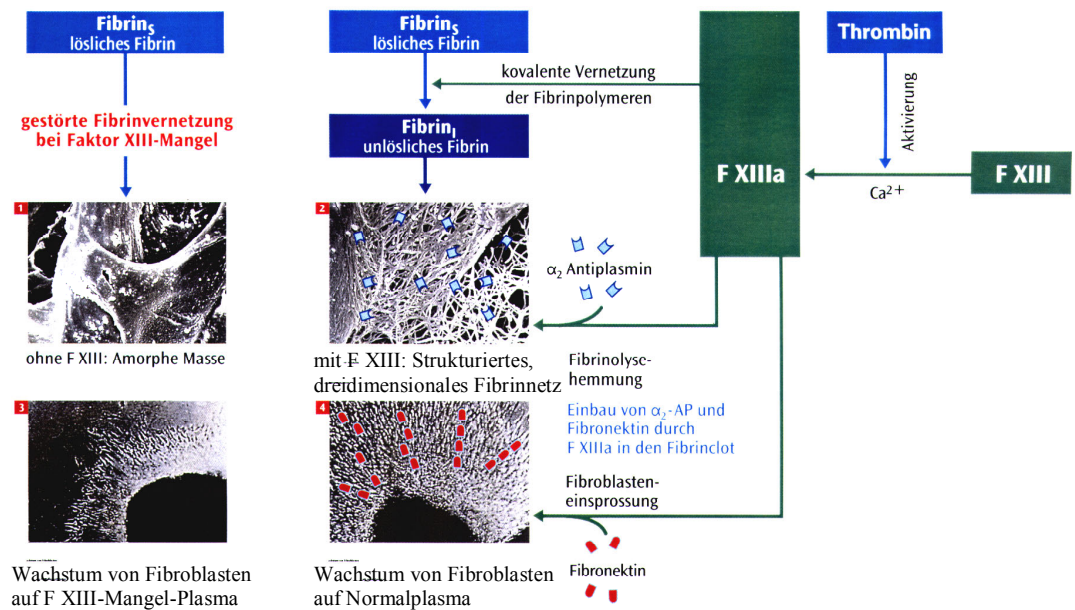


Abb. 17: Funktionen des Faktor XIII bei der Blutstillung, Wund- und Knochenbruchheilung (nach BECK et al. 1961, KOTTMANN und WITZKE 1978)

Die Halbwertszeiten nach intravenöser Applikation liegen bei 5-12 Tagen für die a-Untereinheit und bei 5 h für die b-Untereinheit (OSTERMANN 1999).

Der positive Effekt von Faktor XIII auf die Wundheilung ist durch experimentelle Studien belegt. Er führt in Verbindung mit Thrombin zu einer stabilen Fibrinvernetzung und einer Steigerung der Fibroblastenproliferation (MIYACHI et al. 1993). In vitro-Studien zeigten seine Wirkung auf Zelladhäsion (PAYÉ und LAPÉRE 1986, UEKI et al. 1996) und Zellmigration (KNOX et al. 1986), Kollagensynthese (PAYÉ und LAPÉRE 1986), Mitoserate (BECK et al. 1961, CLAES et al. 1987) von Fibroblasten und Osteoblasten.

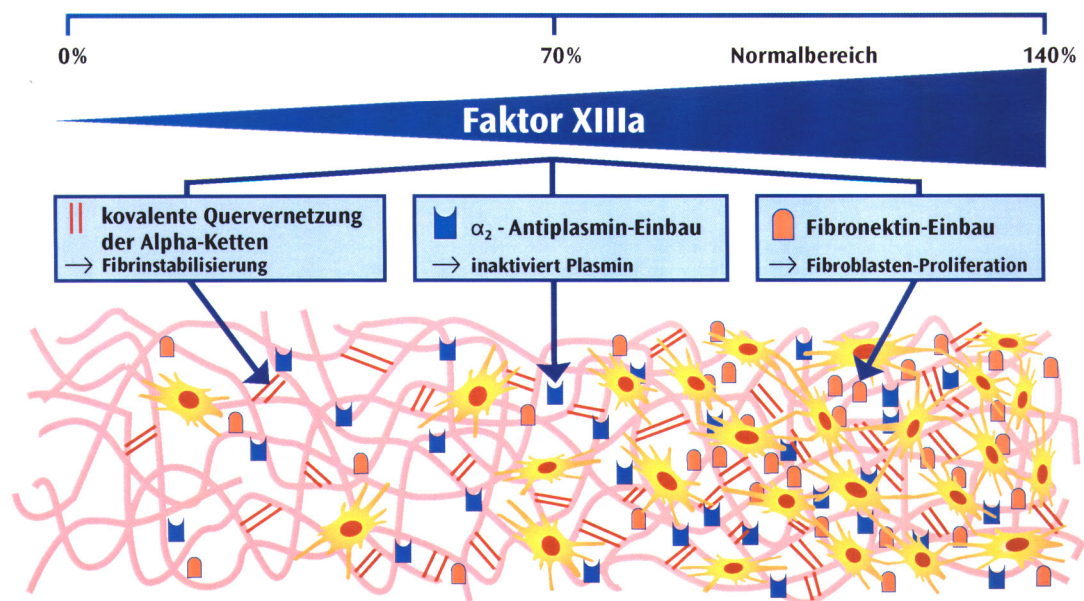


Abb. 18: : Wirkungsweise des Faktor XIII in Abhängigkeit von der Konzentration
(KOTTMANN und WITZKE 1978)

4.3.3 Gewinnung und Herstellung von Faktor XIII Konzentraten

Nachdem 1948 LAKI und LÓRÁND den fibrinstabilisierenden Faktor (später Faktor XIII) im Plasma entdeckten, war es erstmalig möglich, den Nachweis für Faktor XIII-Mangelsyndrome aufzudecken. So wurden gehäufte Aborte bei Frauen im Zusammenhang mit einem Faktor XIII-Mangelsyndrom angegeben. Der erste therapeutische Einsatz zur Prophylaxe von vermehrten Blutungen während Schwangerschaften bei Faktor XIII-Mangelsyndromen wurde durch Plasmatransfusionen durchgeführt (FISHER et al. 1966). Seit Bekanntwerden, des Vorhandenseins von Faktor XIII im Plazentagewebe, wurde er erstmalig durch die Behringwerke AG, Marburg 1972 aus diesem Gewebe isoliert und für die klinische Anwendung eingesetzt (BOHN und EMMERICH 1976).

Inzwischen gibt es zahlreiche industriell hergestellte Konzentrate, die den Faktor XIII entweder aus humanem Plazentagewebe oder aus Plasma isolieren. Die Aktivität beider Konzentrate ist vergleichbar, obwohl es scheint, dass die Wirkung von Plasmakonzentraten etwas höher ist (KARGES und RAPP 1993).

Ende der 80er Jahre gelang es den Arbeitsgruppen BRÖKER et al. (1988) und BISHOP et al. (1990) in Hefepilzkulturen den Faktor XIII erstmalig gentechnisch herzustellen.

Vergleichende Studien zur Wirksamkeit von rekombinantem und plazentärem Faktor XIII zeigten divergierende Ergebnisse. So sahen NAGELSCHMIDT et al. (1993) in einem Wundheilungsmodell der Ratte Vorteile für den rekombinanten Wirkstoff, dagegen berichteten KIENAPFEL et al. (1995, 1997) von besseren Ergebnissen im Knocheneinwachsverhalten am Schafsmodell für das nichtrekombinant hergestellte Faktor XIII-Konzentrat.

In der klinischen Praxis wird derzeit nur das Faktor XIII-Konzentrat (Fibrogammin® HS) aus humanen Plasma favorisiert. Es ist abzuwarten, ob in Zukunft ein wirkungsvolleres Faktor XIII-Konzentrat rekombinant hergestellt werden kann.

4.3.4 Labordiagnostik des Faktor XIII

Mit üblichen Routinegerinnungstests kann eine Faktor XIII-Konzentration nicht bestimmt werden, da die Wirkung erst nach der primären Bildung eines Gerinnsels einsetzt. Den Bestimmungsmethoden für den Faktor XIII können verschiedene Prinzipien zugrunde liegen:

- Prüfung der Gerinnselstabilität und –festigkeit
- Einbau von markierten Substraten
- Immunelektrophorese
- Messung des bei der Quervernetzung freigesetzten NH_3 .

Da sich semiquantitative Messungen der Gerinnselstabilität („clot solubility test“) oder quantitative Bestimmungen durch den Einbau von markierten Substraten als zu zeitaufwendig und ungenau erwiesen, war es das Ziel, ein automatisiertes Verfahren zu entwickeln. Dies gelang mit der Messung des Ammoniaks, das bei der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Lysin und Glutamin freigesetzt wird. Auf dieser Grundlage wurde ein kommerziell erhältlicher Test entwickelt (Berichrom®, DADE Behring, Marburg, BRD), der auch für die Anwendung in einem Routinelabor geeignet ist. In dem zu testenden Plasma wird durch Zugabe von Thrombin der Faktor XIII aktiviert. Fibrinogen muss hierbei nicht entfernt werden, da mit einem niedermolekularen Inhibitor die Fibrinpolymerisation verhindert wird. Der gebildete aktivierte Faktor XIII in der Untersuchungsprobe katalysiert eine kovalente Bindung zwischen speziell entwickelten synthetischen Substraten, wobei Ammoniak frei wird. Letzteres wird über eine Farbreaktion gemessen.

Die Plasmanormalwerte werden für das Berichrom®-Testkit mit 70-120 % angegeben.

4.3.5 Tierexperimentell chirurgische Anwendung

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Wirkungsnachweis von Faktor XIII am Wundheilungsmodell wurden schon in den 70er Jahren mit aus Plazentagewebe isolierten Faktor XIII durchgeführt (BIEHL et al. 1971).

Nicht alle Studien konnten einen überzeugenden Nachweis für die positive Wirkung von Faktor XIII auf die Wundheilung erbringen. So berichteten KIRSCHNER et al. (1977), MARKTL und RUDAS (1974) und TAUBER et al. (1974) nach systemischer Faktor XIII-Gabe über keine oder nur geringfügige Verbesserungen der Wundheilung. Dies konnte sowohl methodisch als auch dosierungsbedingt sein. Da bei den verwendeten Tieren nur kleine Eingriffe erfolgten (Hautschnitte, Faszien Schnitte, Zahnextraktionen, Untersuchungen aus Granulationsgewebe), sind hierbei keine wesentlichen postoperativen Faktor XIII-Abfälle erzielt worden. Daher ist hier keine echte Substitution durchgeführt, sondern ein Vielfaches der Normkonzentration im Plasma erzielt worden.

Um der klinischen Situation einer Wundheilungsstörung unter Faktor XIII-Mangel auch im Tiermodell näherzukommen, wurden Tiermodelle mit reduzierter Faktor-XIII-Plasmakonzentration oder gestörter Wundheilung entwickelt. Als Beispiel sei die Untersuchung von BLÜMEL et al. (1974) genannt, die im Tierexperiment Faktor XIII-Werte um 50 % der Norm durch Anwendung von Defibrase erreichten. Durch die Substitution mit Faktor XIII wurde eine Verbesserung der Reißfestigkeit von Hautwunden an Ratten nachgewiesen, die am 4. und 5. postoperativen Tag statistisch signifikant waren.

Dagegen zeigten Untersuchungen von METZNER et al. (1999) bei normalem Faktor XIII-Plasmaspiegel, dass ein in Hefezellen rekombinant hergestelltes Faktor XIII-Konzentrat an Schnittwundenmodellen bei Ratten und Meerschweinchen dosisabhängig signifikant erhöhte Reißfestigkeiten erreichten. Der Anstieg der Reißfestigkeit erhöhte sich nach 4 Tagen um 20-30 % im Vergleich zu den Kontrollen.

Neben Wundheilungsuntersuchungen mit Faktor XIII wurden zahlreichen Arbeiten an Knochenheilungsmodellen durchgeführt. KIENAPFEL et al. (1995) fanden nach 9-tägiger Faktor-XIII-Behandlung bei Schafen eine signifikant erhöhte Verankerungsfestigkeit eines metallspongiösen Implantates im Knochen. In einer Arbeit von SCHWAB et al. (1999) konnte eine signifikant verbesserte primäre Knochenbruchheilung am Schafsmetatarsus nachgewiesen werden. Den Einfluss der Faktor-XIII-Dosis auf die Heilung von Frakturen der Rattentibia wurde durch CLAES et al. (1999) belegt. Die höchsten Biegebruchmomente und Kallusflächen

zeigten die Gruppen mit einer insgesamt 10-tägigen Gabe von 10 bzw. 50 IE Faktor XIII pro kg Körpergewicht. Durch die gleiche Arbeitsgruppe konnte eine beschleunigte Kallusreifung nach Segmenttransport am Schafsmetatarsus unter Einsatz von Faktor XIII belegt werden (CLAES et al. 1999).

Die positiven Effekte des Faktors XIII in der Knochenbruch- bzw. Kallusheilung sind nach CLAES et al. (1999) und SCHWAB et al. (1999) auf die fibrinvernetzende und die fibroblastenproliferationsfördernde Rolle in den Frühphasen der knöchernen Konsolidierung zurückzuführen.

4.3.6 Klinisch chirurgische Anwendung

Von zahlreichen klinischen Beobachtungen ist bekannt, dass eine enge Beziehung zwischen der Größe des Weichteiltraumas, prädisponierenden Risikofaktoren der Patienten, dem Auftreten von Wundheilungsproblemen und der postoperativen Abnahme der Faktor XIII-Konzentration besteht (SCHMIDTLER et al. 1977, SCHRAMM et al. 1977).

Es wurden nach großflächigen Verbrennungen (ERLEBACH und HARTUNG 1999, TROBISCH und BRANDT 1983), Abdominaloperationen (ENGELHARDT et al. 1983, MUTO 1997), Hüfttotalendoprothesen-Implantationen (BARTHELS et al. 1993, ENGELHARDT et al. 1983), Tumorresektionen im Kopf-Hals-Bereich (BROCKMEIER und ARNOLD 1999, CHAOUI et al. 1999, DAVIDS und HODEL 1999, SILBERZAHN 1993), Sepsis assoziierten Hautläsionen (REICHENBERGER et al. 1999) und anderen größeren operativen Eingriffen, von erheblichen erworbenen und substitutionsbedürftigen Faktor XIII-Mangelzuständen berichtet.

Bei Patienten mit therapierefraktären Wundheilungsstörungen (Fistel bzw. Nahtdehiszenz) und Faktor XIII-Mangel führte die Therapie mit Faktor XIII zu einer signifikanten Besserung der Wundverhältnisse, zu einer Verkleinerung der Wundflächen bzw. zu einer Verringerung der Fisteldrainagevolumina. Der klinische Verlauf korrelierte mit der Faktor XIII-Aktivität im Plasma. Eine Besserung der Wundverhältnisse trat nur auf, wenn der Faktor XIII-Spiegel oberhalb von 70 % lag (MISHIMA et al. 1984).

In einer prospektiv randomisierten Studie bei Patienten mit Defektpseudarthrosen der langen Röhrenknochen, zeigte nach einem standardisierten operativen Vorgehen die Verumgruppe (2 x tgl. 1250 IE Faktor XIII für 7 Tage) gegenüber der Kontrollgruppe eine frühere Vollbelastungsrate, eine schnellere knöcherne Konsolidierung und geringere Reoperationen (GERNGROß et al. 1987).

Die lokale Applikation von Faktor XIII wurde ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Bei 54 Patienten mit Ulzerationen der unteren Extremität unterschiedlicher Genese führte diese Anwendung zu einer deutlichen Verbesserung der Wundheilung (WOZNIAK et al. 2001). Die klinischen Befunde der Therapie des diabetischen Malum perforans unterstützen die Vermutung, dass der plasmatische Faktor XIII insbesondere eine Wirkung auf die Sekretionskontrolle hat, die auf eine Reduktion der Permeabilität der endothelialen Schranke beruht. Diese kann bei Diabetikern erheblich gestört sein. Die erhöhte Granulationstendenz ist durch eine Vernetzung von verschiedenen lokalen Proteinen und die Folge einer verminderten Transsudation im endothelialen Bereich erklärbar (WOZNIAK et al. 1999).

5. Zielsetzung

In der tierexperimentellen Untersuchung sollte der Einfluss des fibrinstabilisierenden Faktors XIII und die „Transplantat-Splitting-Technik“ auf den Umbauprozess des Patellarsehnentransplantates als vorderer Kreuzbandersatz untersucht werden. Es wurde angenommen, dass sowohl die Applikation des fibrinstabilisierenden Faktors als auch die sogenannte „Transplantat-Splitting-Technik“ die Umbauprozesse beschleunigt und die Ernährungssituation während des Transplantatumbaus verbessert.

Als Hypothese wurde formuliert, dass beide Faktoren die biomechanischen Eigenschaften eines vorderen Kreuzbandtransplantates optimieren. Die Beweisführung sollte mit histologischen, morphometrischen, biochemischen und biomechanischen Methoden durchgeführt werden.

6. Material und Methoden

6.1 Geräte und Chemikalien

Für den Tierversuch wurden folgende Medikamente von nachstehenden Firmen bezogen: Diazepam (Ratiopharm, Ulm, BRD), Hypnorm® (Jansen, Leyden, Niederlande), Baralgin® (Hoechst, Frankfurt/M, BRD), Pentstrep-400® (Interchemie, Werben, Niederlande), Betaisodona® (Mundipharma, Limburg, BRD), Rompun® (Bayer, Leverkusen, BRD), Ketamin (Parke-Davis, Berlin, BRD) Trapanal (BYK Gulden, Konstanz, BRD), Human-Albumin®5% und Fibrogammin® HS (Aventis Behring, Liederbach, BRD).

Die Faktor XIII-Analyse wurde mit dem Berichrom®-Kit der (DADE Behring Marburg, BRD) durchgeführt.

Die Ausrissversuche wurden an der Prüfmaschine (Zwick 1455, Zwick GmbH, Ulm, BRD) durchgeführt, die Einbettung der Röhrenknochen erfolgte in Polyacryl (Beracryl®, Fulenbach, Schweiz).

Für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden folgende Chemikalien verwendet: vergällter Alkohol, Cacodylatpuffer pH 7,3 (Dr. Holborn & Söhne, Leipzig, BRD), Chloroform, Xylol, absoluter Alkohol (Baker, Deventer, Niederlande), Eiweißglycerin (Chroma, Hagen, BRD), Tissue Tec (Miles Inc., Ohio, USA), Fuchsin (Sojuschemie, Moskau, GUS), Ponceau, Bleicitrat, DDSA-Eponhärter, Epon 812, Propylenoxid, DePex-Eindickmittel, Bleicitrat (Serva, Heidelberg, BRD), 25 % Glutaraldehyd, Uranylacetat, Saccharose, 1 N Natron-lauge, Lichtgrün, Orange G, Essigsäure 100 %, Eisen-III-chlorid, Hämatoxylin, Eosin, Paraffin, Neofix®-Fixierlösung (Merk, Darmstadt, BRD), Osmiumsäure / Osmiumteroxyd, Gelantinekapseln (Planet GmbH, Wetzlar, BRD), MNA (Balzers, Lichtenstein), 2, 4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol (Fluka Chemie, Steinheim, Schweiz), Aqua bidestilata steril (Aqua Braun, Melsungen, BRD), Aqua destilata (Charité Hausapotheke, Berlin, BRD).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Standardlichtmikroskop, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Zeiss II-Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, BRD) durchgeführt.

Für die Analyse des Gesamtkollagengehaltes und der Konzentration der nichtreduzierbaren Quervernetzungen dienten zur Vorbehandlung der Proben ein Trockenschrank (WTC binder, Tuttlingen, BRD), ein pH-Messgerät MV 88

(Präzisions-Labor-pH-Messgerät, VEB PRÄCITRONIC, Dresden, ehemalige DDR) und eine elektronische Präzisionswaage MC 1 (Sartorius AG, Göttingen, BRD).

Des Weiteren wurde für die Hydroxyprolinanalyse ein Rotationsmischer 3 300 und Thermostat 3 401 (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg, BRD) sowie ein Photometer (SUMAL PE 2, Carl Zeiss, Jena, BRD) verwendet.

Folgende Chemikalien wurden eingesetzt: Phosphor(V)-Oxid (Merck, Darmstadt, BRD), L-Hydroxyprolin (Serva, Heidelberg, BRD), Chloramin T (Natrium N-Chloro-p-Toluolsulfonamid), 2-Propanol, Pufferstammlösung (25 g Zitronensäure-Monohydrat, 96 %ige Essigsäure, Natriumacetat-Trihydrat, Natriumhydroxid, Aqua bidestillata, Toluol, 2-Propanol, DAB-Perchlorsäure-Lösung, 4-Dimethylaminobenzaldehyd, 70 %ige Perchlorsäure, Kalium-hydroxid, Kalziumchlorid (Merck, Darmstadt, BRD).

Für die Konzentrationsbestimmung der nichtreduzierbaren Querbrücken wurden kommerzielle ELISA-Kits verwendet. Die notwendigen Lösungen, Kontrollen, Standards und Materialien sind in den ELISA-Kits enthalten (PYRILINKS® Metra Biosystems, Inc., Mountain View, USA, IMMULITE® Pyrilinks-D, DPC, Los Angeles, USA).

Die für die Kollagentypisierung erforderlichen Geräte und Materialien werden im Folgenden genannt. Die Zentrifuge 5 402 und der Thermomixer 5 436 stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg, BRD). Es wurden

3ml all-glas Potter-Homogenisatoren der Firma Novodirect (Kehl, BRD), konische Reaktionsgefäße (15 ml) der Firma NALGE Company (New York, USA) verwendet sowie ein Rüttler (Heidolph Polymax 2 040, Füssen, BRD) während der Bromzyanspaltung genutzt. Die Lyophilisation erfolgte mittels des Gerätes ALPHA 2-4 der Firma Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode, BRD). Weitere Chemikalien, wie PBS (Seromed, Berlin, BRD), Bromzyan (Fluka Chemie AG, Steinheim, BRD) wurden eingesetzt.

Für die Elektrophorese dienten folgende Chemikalien und Geräte: Power Supply, XCELL II™ -Mini-Cell und 4-20 % Tris-Glycin-Gele (1,5 mm) der Firma NOVEX™ (San Diego, USA). Die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese stammte von (Fa. Bio-Rad Laboratories, Los Angeles, USA).

Die Kollagenstandards Typ I (bovine fetal skin) und III (bovine skin) wurden von der Firma Chemicon (Hofheim/Ts, BRD) bezogen.

6.2 Tierexperimenteller Versuchsaufbau

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene Kaninchen der Rasse „New Zealand White“ SPF verwendet. Hierbei bedeutet SPF - specific pathogen free und das die Tiere regelmäßig auf für Kaninchen spezifische pathogene Erreger virologisch, bakteriologisch, parasitologisch und mykologisch im Zeitraum vom 01.09.1996 – 20.10.1997 untersucht wurden. Die Untersuchungen wurden in der veterinärmedizinischen Abteilung des Pharmakologischen Institutes der Firma GRINDEX (Riga, Lettland) durchgeführt.

Die Tiere hatten zum Operationszeitpunkt ein mittleres Körpergewicht von 3720 g (3450 - 4305 g) sowie ein durchschnittliches Alter von 7,2 Monaten (7,0 - 8,7 Mo.). Die Epiphysenfugen waren bereits verschlossen.

Vor der operativen Intervention wurden die Tiere 14 Tage zur Akklimatisierung an die konventionelle Tierhaltung in Quarantäne gehalten, zur Anpassung an die Stallgewohnheiten.

Alle verwendeten Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten (400 mm hoch, 400 mm breit, 600 mm tief), sie erhielten spezielles Kaninchentrockenfutter (HEMO GmbH, Scheden, BRD) sowie Trinkwasser ad libitum. Der Licht-Dunkel-Wechsel betrug 12/12 Stunden, die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit wurden automatisch kontrolliert. Die Luftumwälzung erfolgte 10-15 mal pro Stunde bei einer Luftfeuchtigkeit von 45 % +/- 5 %.

Die Operationen wurden in einem Tieroperationsaal des 1. Traumatologisch-Orthopädischen Institutes der Stadt Riga durchgeführt. Die Pflege und fortlaufende veterinärmedizinische Betreuung wurde entsprechend den Konventionen von Leyden in der veterinärmedizinischen Abteilung des Pharmakologischen Institutes der Firma GRINDEX (Riga, Lettland) abgesichert.

Eine Genehmigung für die Durchführung der Tierexperimente lag von der Ethikkommission des Pharmakologischen Institutes der Firma GRINDEX (Riga, Lettland) in schriftlicher Form vor.

6.2.1 Versuchsgruppen

Für die wissenschaftlichen Fragestellungen erfolgte in der präoperativen Planung eine entsprechende Gruppeneinteilung. Es wurden insgesamt drei Operationsgruppen und eine Kontrollgruppe gebildet. Die Zuteilung der Tiere zu den Gruppen erfolgte randomisiert, wie unter 6.2.2 beschrieben.

1. Gruppe A (n = 24):
vordere Kreuzbandplastik mit Patellarsehnentransplantat in Standard-versorgungstechnik
2. Gruppe B (n = 24):
vordere Kreuzbandplastik mit Patellarsehnentransplantat und Faktor XIII-Applikation
3. Gruppe C (n = 24):
vordere Kreuzbandplastik mit Patellarsehnentransplantat in Transplantat-Splitting-Technik und mit Faktor XIII-Applikation
4. Gruppe D (n = 8):
Kontrollgruppe, ohne Operation zur Verlaufskontrolle des Faktor XIII-Plasmaspiegels und der Osteoarthrosedokumentation

6.2.2 Randomisierung der Versuchstiere

Es erfolgte die Randomisierung von 80 Kaninchen nach geplanter Beobachtungszeit und der Zuteilung zur entsprechenden Operationsgruppe mittels Zufallszahlenverteilung (Wissenschaftliche Tabellen, Geigy 1982). Die Gruppen A-C bestanden aus jeweils 24 Tieren, die sich entsprechend ihrer Untersuchungszeitpunkte in Untergruppen von je 8 Tieren aufteilten. Es wurden jeweils beide Kniegelenke operiert, wobei die linken Kniegelenke für die morphologischen sowie biochemischen Untersuchungen genutzt wurden und die rechten Kniegelenke ausschließlich der biomechanischen Testung dienten.

Bei den 8 Tieren der Kontrollgruppe wurde während des gesamten Untersuchungsverlaufes der Faktor XIII-Plasmaspiegel bestimmt. Weiterhin dienten diese Gelenke als Referenzgruppe zum Vergleich der radiologischen osteoarthrotischen Veränderungen, der histologischen, morphometrischen und biochemischen Untersuchungen für die Patellarsehne und dem vorderen Kreuzband sowie für die biomechanische Untersuchung.

6.3 Operationsmethoden

Die Betäubung erfolgte durch eine intramuskuläre Applikation eines Ge-misches aus 2 mg/kg Diazepam und 0,3 ml/kg Rompun® in den rechten Hinterlauf. Postoperativ wurde einmalig zur Schmerztherapie Baralgin® sowie zur antibiotischen Abschirmung Pentstrep-400® jeweils intramuskulär ver-abreicht. Unter Narkosebedingungen wurden die Hinterläufe rasiert.

Nach dreimaliger chirurgischer Hautdesinfektion mit Betaisodona® und steriler Abdeckung erfolgte ein gerader Hautschnitt frontal zwischen der Kniescheibe und dem Unterrand der Tuberositas tibiae. Die Patellarsehne spannte sich in leichter Beugung gut an und wurde vom Paratenon befreit. Aus dem zentralen Drittel der Patellarsehne wurde ein 3 mm breiter Streifen mit endständigen Knochenblöcken von der Patella und der Tuberositas tibiae entnommen.

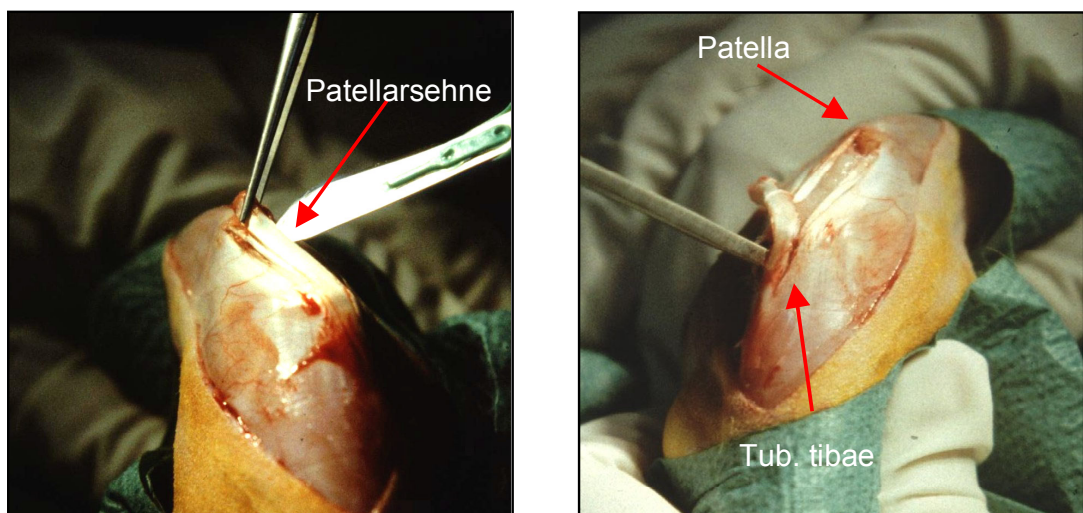


Abb. 19: a, b: Entnahme des zentralen Patellarsehnenstreifens mit einem quaderförmigen Knochenblock aus dem kaudalen Patellapol und der Tuberositas tibia.

Anschließend erfolgte eine paramediane mediale Arthrotomie und die Lateralisation der Patella. Nach Exzision des vorderen Kreuzbandes wurde femoral 0,5 cm tief und tibial durch den gesamten Schienbeinkopf ein 2,7 mm starker Bohrkanaal angelegt.



Abb. 20: Anlage des transtibialen Bohrkanals von 2,7 mm. Die Lage des Bohrkanals liegt ca. 60° in der Sagittalebene und 15-20° in der Frontalebene.

Die weitere Transplantatbearbeitung unterschied sich für die einzelnen Untersuchungsgruppen. Für die Gruppen A und B erfolgte keine weitere Bearbeitung des Knochen-Patellarsehnen-Knochen-Transplantates. Für die Gruppe C wurde das Transplantat mit einem Skalpell standardisiert im Faserverlauf gespalten (Splitting-Technik). Hierbei entstand ein Transplantat mit drei gleichstarken kollagenen Faserbündeln. Diese Technik wird in den weiteren Beschreibungen als „Splitting-Technik“ bezeichnet.



Abb. 21: Patellarsehnentransplantate mit endständigen Knochenblöcken.: Links: Standardtransplantat. Rechts: Transsplantat in drei Hauptbündel gesplittet.

Vor dem Einzug der Transplantate wurden diese auf einem suture board 10 Minuten mit 5 N gespannt. Der trapezförmige Knochenblock aus der Tuberositas tibia wurde in press-fit Technik femoral eingebolzt. Die tibiale Verankerung erfolgte mit einer Kleinfragment-Spongiosaschraube (2,2 x 10 mm), die nach dem Interferenzschraubenprinzip parallel zum quaderförmigen Knochenblock in 10° Flexion unter 17,5 N Vorspannung eingebracht wurde.

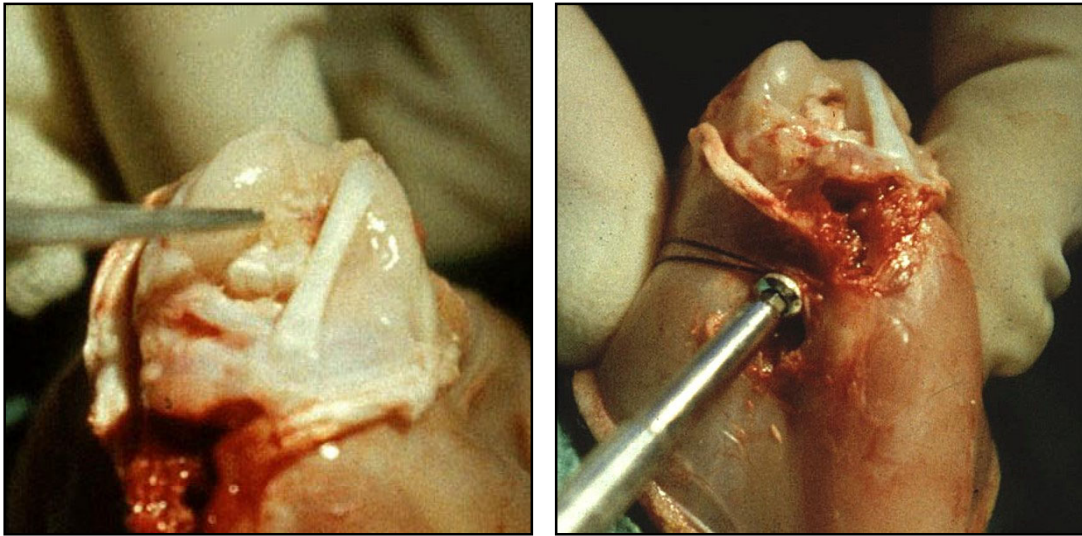


Abb. 22: a, b: Links: Einbolzen des Knochenblockes femoral in press-fit Technik. Rechts: Tibiale Fixierung des Knochenblockes mit einer Kleinfragmentspongiosaschraube.

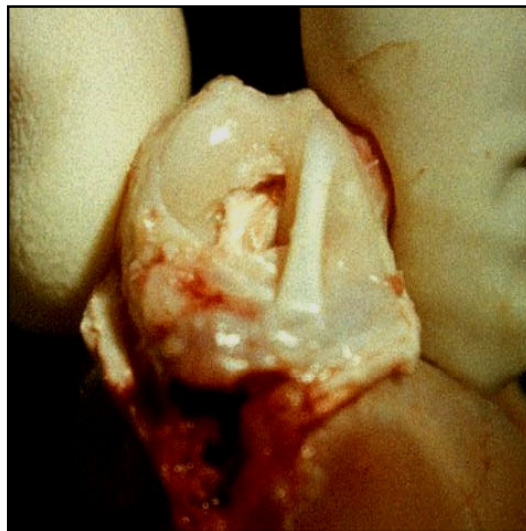


Abb. 23: Abschlussbild des Operationssitus nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mit einem Patellarsehnentransplantat

Postoperativ erfolgte keine Protektion der operierten Extremität.

6.3.1 Nachuntersuchungsintervalle

Die Nachuntersuchungsintervalle wurden auf 2, 32 und 56 Wochen festgelegt. Somit konnte sowohl eine Aussage zum Einheilungsverhalten in der postoperativen Frühphase als auch zur Langzeitprognose der vorderen Kreuzbandtransplantate gegeben werden. Die ausgewählten Zeitintervalle entsprechen Literaturangaben zum Testen von kollagenem Bindegewebe bei Kaninchen (BALLOCK et al. 1989, BLICKENSTAFF et al. 1997, FROMM 1994, SCHIAVONE PANNI et al. 1993).

6.3.2 Explantation

Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden die Tiere mit 5mg/kg Ketamin-HCL und 0,1 ml/kg Rompun[®] jeweils intramuskulär anästhesiert. Die Tötung der Tiere erfolgte aus tiefer Narkose mit einer Überdosis Trapanal[®] intrakardial. Die Hinterläufe wurden beidseits abtrennt und bei –20 °C eingefroren.

6.4 Faktor XIII – Kontrolle

Allen Tieren wurde nach einem festgelegten Protokoll (präoperativ, 1., 3., 5., 7., 14. Tag post operationem, für die Langzeitbeobachtungsgruppen nach 32 und 56 Wochen) Blut aus der Ohrvene abgenommen und eine Faktor XIII-Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Es erfolgte die Aspiration von 2,7 ml Blut in 0,3 ml Zitratlösung, welches unmittelbar nach der Abnahme 2 x 10 Minuten mit 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurde. Der Plasmaüberstand wurde bei –20 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt mit dem Berichrom[®] Test auf die Faktor XIII-Konzentration untersucht.

Die Tiere der Operationsgruppen B und C erhielten jeweils nach vorangegangener Blutabnahme am 1., 3., 5. und 7. Tag post operationem eine intravenöse Faktor XIII Therapie. Die Gruppe A erhielt eine Äquivalenzdosis von 0,5 ml Human-Albumin 5 % ohne Faktor XIII, um einen Wirkanteil des Albumins in den Gruppen B und C auszuschließen. Den Gruppen B und C wurden jeweils 50 IE /kg Körpergewicht Fibrogammin[®] HS appliziert.

Da die nötigen Daten der Faktor XIII-Spiegel in Plasma und Synovia für Kaninchen aus der Literatur nicht ermittelt werden konnten, war es erforderlich, eigene pharmakokinetische Untersuchungen in Vorversuchen durchzuführen. Hierfür wurden jeweils 5 Tiere mit 50 IE/kg KM und 100 IE/kg KM Faktor XIII intravenös

behandelt und die Plasmaspiegel des Faktor XIII 10 Minuten vor Gabe, sowie 30 Minuten, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Applikation gemessen. Dabei ergaben sich lediglich bis 4 Stunden nach der Applikation signifikant höhere Werte für die höhere Faktor XIII-Gabe. Von weitaus größerem Interesse war die Konzentration in der Gelenksynovia. Diese wurde 24 Stunden nach intravenöser Applikation gemessen. Aufgrund des geringen Volumens des Kaninchenkniegelenkes konnte keine direkte Aspiration von Synovialflüssigkeit erfolgen. Hierfür wurde die Verdünnungsmethode mit dem Hydroxylstärketest nach HEILMANN et al. (1996) angewandt. Aus den gewonnenen Aspiraten konnte dann näherungsweise unter Berücksichtigung des Synoviavolumens und des Verdünnungseffektes die Faktor XIII-Konzentrationsbestimmung mit dem Berichrome®-Test ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigten sehr geringe Konzentrationen zwischen 50 – 60 % für Faktor XIII, ohne signifikanten Unterschied für die Synovia-konzentration, in Abhängigkeit von der applizierten Dosierung. Im vorliegenden Experiment wurde aus diesem Grund die Applikation von 50 IE/kg KM in den entsprechenden Versuchsgruppen gewählt.

6.5 Makroskopische Befunddokumentation

Nach der Arthrotomie wurde eine makroskopische Befundung folgender Parameter durchgeführt: Farbe der Synovia, Ausbildung des Hoffa-Fett-körpers, Verwachsungen, Verklebungen, Synovialisierung des Trans-plantates und Straffheit des Transplantates. Die Evaluierung des Knorpel-status ist unter Abschnitt 6.6 beschrieben.

6.6 Knorpelstatus und Osteoarthrosedokumentation

Die Einschätzung und Beurteilung des Knorpelstatus bei Kleintieren ist sehr schwierig und subjektiven Einflussfaktoren unterlegen. Zur Beurteilung wurden die makroskopische Befundung des Untersuchers, die Beurteilung der Röntgenuntersuchung des Kniegelenkes in zwei Ebenen und die lichtmikroskopische Betrachtung des Knorpels herangezogen. Die Beurteilung der histologischen Veränderungen der Kniegelenke auf das Ausmaß der Arthrose erfolgte mit Hilfe des MANKIN-Score, der mehrfach bei Untersuchungen an Kleintieren in der Literatur Anwendung fand (MACHNER et al. 1999, MANKIN et al. 1971, NEIDEL et al. 1998, PAP et al. 1998). Die Präparate wurden zum Ausschluss einer Beobachterbeeinflussung kodiert. Entsprechend den Angaben in der Literatur wurden vier Schweregrade der Arthrose unterschieden.

Grundlage hierfür waren die erreichten Punktwerte im MANKIN-Score. Hierbei wurde differenziert in: Grad 0 - keine Arthrose (0 Punkte), Grad I – leichte Arthrose (1-5 Punkte), Grad II – mäßige Arthrose (6-11 Punkte) und Grad III – schwere Arthrose (11-

14 Punkte). Die Einstufung des Schädigungs-grades des Kniegelenkes erfolgte dabei anhand der stärksten Schädigung, wobei Tibia und Femur jeweils getrennt wurden.

6.7 Ausrissfestigkeitsuntersuchungen

Die Ausrissversuche wurden zu einem späteren Zeitpunkt nach dem Auftauen der Präparate unter standardisiertem Vorgehen durchgeführt. Die Kniegelenke wurden vollständig von den umgebenen Weichteilen befreit und die Knochen deperiostiert. Lediglich das vordere Kreuzband blieb erhalten. Die Femura und die Tibiae wurden in Beracryl® gegossen und mit Spezialklemmbacken in der Prüfmaschine fixiert. Der Flexionswinkel des Kniegelenkes betrug 60° um eine streng axiale Zugwirkung auf das Transplantat zu gewährleisten. Ein Rotieren von Femur und Tibia gegeneinander mit dem Resultat einer scheinbaren Bandverlängerung kann mit dieser Versuchsanordnung ausgeschlossen werden. Vor dem Ausrisstest wurden die Transplantate mit 0,2 N vorgespannt. Der Ausrisstest erfolgte mit einer Prüfgeschwindigkeit von 10 mm/min.

Bei der Bestimmung der Reißfestigkeit des transplantierten Kreuzbandes wird das Band inklusive seiner femoralen und tibialen Insertionen gemessen. Dieses Vorgehen erlaubt die sichere Verankerung des Kreuzbandes und ist bei der geringen Länge des Transplantates die technisch einzig mögliche Lösung. Die isolierte Untersuchung des Patellarsehnentransplantates war aufgrund der kleinen Dimension in der verwendeten Messapparatur nicht möglich.

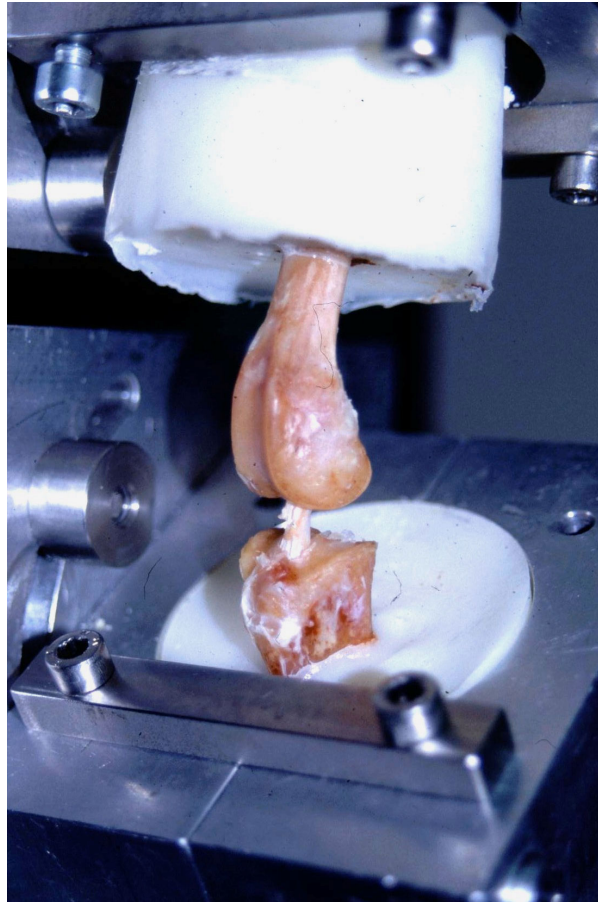


Abb. 24: Messapparatur für die biomechanische Testung der Transplante. Streng axiale Ausrichtung der Zugrichtung für das VKB-Transplantat.

Der Ausrissmechanismus wurde in einer Kraft-Dehnungs-Kurve dokumentiert. Kraft-Dehnungs-Kurven von Sehnen und Bändern zeigen einen typischen mehrphasigen Verlauf, was in der Mikrostruktur des elastischen Gewebes begründet ist. Folgende Parameter wurden aus den Ausrissversuchen zur Bewertung herangezogen: maximale Reißfestigkeit, die Steifigkeit im linearelastischen Bereich und der Ausrissmechanismus (Transplantatruptur, Avulsion, Knochenblockausriss). Während der Untersuchung erfolgte die ständige Befeuchtung der Transplantate mit physiologischer Kochsalzlösung.

Für die Referenzdaten des vorderen Kreuzbandes wurden 8 Kniegelenke der Kontrollgruppe untersucht.

6.8 Histologische und histomorphometrische Untersuchungen

6.8.1 Übersichtslichtmikroskopie

Nach dem Ausrissversuch wurden die Bandanteile in Neofix® fixiert und in Paraffin eingebettet. Die angefertigten 6 µm starken Längs- und Querschnitte erhielten alternierend Hämatoxilin-Eosin, Masson-Goldner und van Gieson Färbungen im standardisierten Vorgehen und wurden histologisch und histomorphometrisch ausgewertet.

In der Übersichtslichtmikroskopie wurden Granulations- und Nekroseareale bestimmt sowie die Transplantate auf Kollagenausrichtung beurteilt. Die Erfassung dieser Kriterien erfolgte in den zentralen Transplantatanteilen. Im Weiteren wurden die Insertionszonen sowie die knöcherne Integration der Knochenblöcke femoral und tibial beurteilt.

Die Beurteilung der Knorpelschädigung erfolgte in femoralen Sagittal- und tibialen Frontalschnitten in Hämatoxilin-Eosin und Safranin-O Färbungen mit Hilfe des MANKIN-Scores durchgeführt (MANKIN et al. 1971).

6.8.2 Histomorphometrie

Zur Ermittlung der stereologischen Messwertparameter wurde ein quadratisches Raster mit 121 Messpunkten (Pt) und konstanter Periodenlänge (a) zwischen den Punkten nach HAUG (1955) benutzt. Die Ermittlung der Messwerte erfolgte in der Immersionsauflichtmikroskopie bei 1000-facher Vergrößerung. Es wurden die so genannten Primärparameter erfasst und unter Nutzung stereologischer Gleichungen die Sekundärparameter, wie Volumen- und Flächenwerte berechnet (LABS 1993, WASSILIEW 1977, WEIBEL und ELIAS 1967).

Bestimmung der Primärparameter

- Erfassen der Objekte im Raster (NZ)
Es werden alle Objekte, die vollständig im Raster liegen, als ganze Objekte gezählt. Sind Objekte angeschnitten, werden sie als halbe Objekte gezählt.
- Trefferpunkte über den Objekten (PZ)
Als Trefferpunkte werden die über den Objekten liegenden Kreuzungspunkte der Linien des Rasters gezählt.
- Schnittpunkte der Senkrechten mit den Objekten (CZ)
Es werden die Schnittpunkte der senkrechten Linien mit den Zellen gezählt.

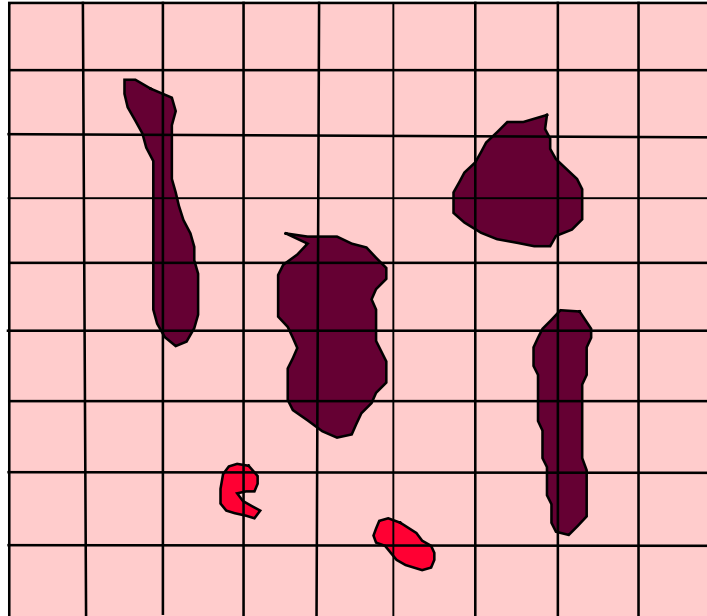


Abb. 25: Schematische Darstellung eines Rasterbildes. Es befinden sich vier Fibroblasten (NZ = 4, PZ = 12, CZ = 10) und zwei Gefäßanschnitte (NZ = 2, PZ = 2, CZ = 6) im Einheitsfeld

Bestimmung der Sekundärparameter

- Zellzahl pro Einheitsfläche (NAZ)
Sie errechnet sich aus dem Quotienten von Zellzahl und dem Produkt zweier Konstanten (Gesamtpunktezahl im Raster und dem Quadrat der Periodenlänge).

$$\text{NAZ [1/}\mu\text{m}^2] = \text{NZ} / (\text{Pt} \times a^2)$$

- Mittleres Zellvolumen (VZ)
Das mittlere Zellvolumen wird aus dem Quotienten von Volumendichte und numerischer Dichte bestimmt.

$$\text{VZ [}\mu\text{m}^3] = \text{VVZ} / \text{NVZ}$$

Die Volumendichte (VVZ) der Fibrozyten und Fibroblasten entspricht dem Quotienten aus der Anzahl der Trefferpunkte über den Zellen und der Gesamtpunktezahl des Rasters.

$$\text{VVZ [}\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3] = \text{PZ} / \text{Pt}$$

Die Berechnung der numerischen Dichte (NVZ) beruht auf der Relation von Zellzahl pro Einheitsfläche und Volumendichte, entsprechend dem Volumen der Zellen pro Einheitsvolumen. Des Weiteren gehen ein Form- und ein Größenfaktor ein.

$$NVZ [\mu\text{m}^3] = (k / \beta) \times (NAZ \times 1,5 / VVZ \times 0,5)$$

k = Größenverteilungsfaktor

β = Formfaktor

- Mittlere Gefäßschnittsfläche (VAZ)

Sie berechnet sich aus dem Quotienten von Volumendichte und der mittleren Anzahl der Objekte pro Einheitsfläche.

$$VAZ [\mu\text{m}^2] = VVZ / NAZ$$

Im vorliegenden Versuch ist eine Stichprobenanzahl von 120 Gesichtsfelder pro Versuchsgruppe gewählt worden. Alle Primärparameter wurden nach manueller Auszählung in ein Datenerfassungsprogramm eingegeben. Diese Daten wurden mit einem speziell angefertigten Morphometrieprogramm gekoppelt und alle gewünschten Sekundärparameter berechnet (LABS 1993, WASSILIEW 1977).

6.9 Kollagenfibrillenmorphometrie

Aus den Transplantaten unmittelbar oberhalb der tibialen Insertion wurden je 2 Proben der Größe 1 x 1 mm gewonnen und in 0,075 M 1 %- iger Osmium-tetraoxid-Na-cacodylatpuffer (pH 7,35) bei 4 °C eine Stunde fixiert. Dann folgte die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Epoxidharz. Die Kontrastierung wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt. Von jedem Querschnitt wurden 5 Schwarz-Weiß-Fotografien bei 18000-facher Vergrößerung mit einem Transmissions-elektronenmikroskop angefertigt, anschließend digitalisiert und bei 54.000-facher Vergrößerung morphometriert. Im Kalkulationsprogramm (Excel 97, Microsoft, USA) wurden die Parameter Gesamtfläche der Fibrillenfaserschnitte, prozentuale Flächendichte der Fasern, numerische Dichte der Fasern, Medianwert der Fibrillendurchmesser und der Minimum–Maximum-Durchmesser der Fibrillen bestimmt.

Während des Messvorganges erfolgte eine kontinuierliche Ermittlung der Standardabweichung und des Standardfehlers einer Stichprobe. Die Anzahl der Messungen wurde beendet, wenn das Verhältnis aus Standardfehler zu mittlerem Fibrillendurchmesser der Stichprobe unter 0,1 lag, da dann die Stichprobengenauigkeit > 95 % betrug. Zusätzlich erfolgte eine fortlaufende graphische Darstellung der Verteilung der Kollagenfibrillendurchmesser im Intervall mit folgenden Kategorien: 0-25 nm, 25-50 nm, 50-75 nm, 75-100 nm, 100-125 nm, 125-150 nm, 150-175 nm, 175-200 nm, 200-225 nm, 225-250 nm und > 250 nm.

6.10 Biochemische Analyse

Die Bandanteile wurden von Fett- und Synovialisresten freipräpariert. Anschließend erfolgte die Aufteilung der Proben für die Analyse des Hydroxyprolingehaltes und der Konzentrationen der Quervernetzungen sowie für die Kollagentypisierung. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichtes wurden die Proben im Vakuum-Exsikkator getrocknet und das Trockengewicht der einzelnen Proben mittels der elektronischen Präzisionswaage MC 1 ermittelt.

6.10.1 Quantitative Hydroxyprolinbestimmung

Die Methode nach STEGEMANN und STALDER (1967) fand eine modifizierte Anwendung.

Zu den im Vakuum-Exsikkator getrockneten Proben wurde zur Säurehydrolyse je 1 ml 6 N HCl/10 mg Trockengewicht zugegeben. Die Hydrolyse erfolgte in einem Trockenschrank bei 100 °C über 24 Stunden (ROBINS 1982).

Anschließend trockneten die Analyseproben erneut im Vakuum-Exsikkator für 5 Tage.

Nach dieser Vorbereitung des Untersuchungsmaterials wurden die Analyse- und Standardproben mit Aqua bidestillata verdünnt. Die Standardproben enthielten definierte Mengen an L-Hydroxyprolin und dienten der Bestimmung der Bezugskurve.

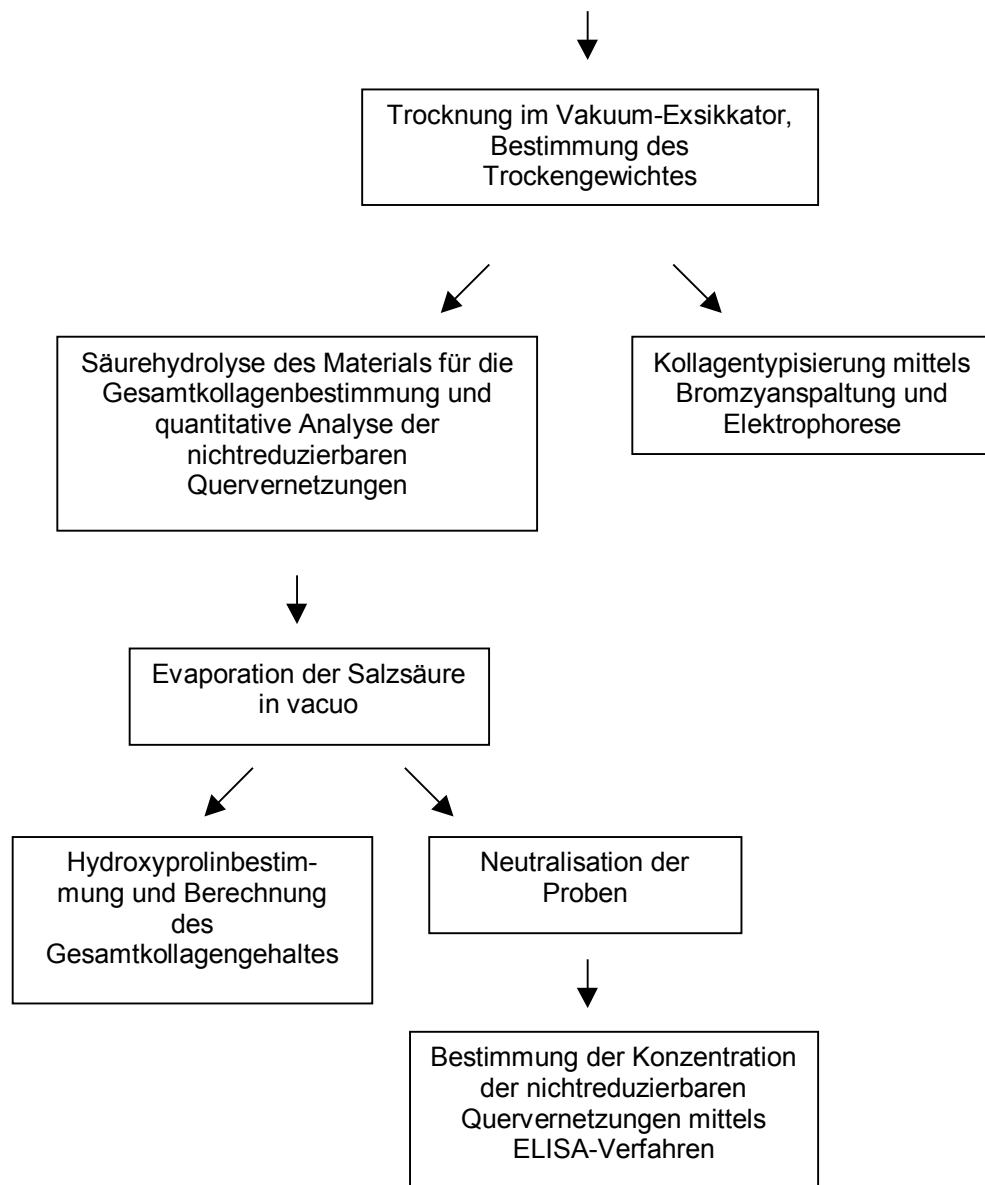


Abb. 26: Ablauf der biochemischen Analyse (Riechert 2001)

Danach wurden zu 200 µl der Probelösungen je 200 µl Chloramin T (Natrium N-Chloro-p-Toluolsulfonamid) und verdünnter Puffer gegeben und auf einem Rotationsmischer gemischt.

Die Dauer dieser Oxidationsreaktion betrug 20 Minuten. Zur Herstellung der Chloramin T-Lösung wurden 0,141 g Chloramin T eingewogen und mit 1,0 ml Aqua bidestillata, 1,0 ml 2-Propanol und 8,0 ml verdünnter Pufferlösung gemischt. Die verdünnte Pufferlösung, die im Vergleich zur Methode von STEGEMANN und STALDER (1967) doppelt so stark war, bestand aus 25 ml Pufferstammlösung (25 g Zitronensäure-Monohydrat, 6 ml 96 %ige Essigsäure, 60 g Natriumacetat-Trihydrat, 17 g Natriumhydroxid, 250 ml Aqua bidestillata und 3 Tropfen Toluol, pH 6,6), 17,5 ml Aqua bidestillata und 7,5 ml 2-Propanol.

Die Oxidationsreaktion wurde durch Zugabe von 200 µl DAB–Perchlorsäure-Lösung gestoppt. Diese Lösung bestand aus 1,5 g 4-Dimethyl-aminobenzaldehyd, 4 ml 2-Propanol und 3,8 ml 70 %ige Perchlorsäure, die mit 2-Propanol auf 10 ml aufgefüllt wurde. Die Eppendorfröhrchen wurden dann für 20 Minuten in einem 56 °C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend über 5 Minuten in kaltem Wasser gekühlt.

Die Exstinktionsmessung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Abschließend wurde auf der Grundlage der Hydroxyprolinkonzentration der prozentuale Kollagengehalt ($F = 7,7$) in den Proben berechnet (EYRE et al. 1984).

6.10.2 Analyse der nichtreduzierbaren Quervernetzungen

Für die Analyse der nichtreduzierbaren Quervernetzungen mittels kommerziellem ELISA ist ein pH-Wert von 7,4 erforderlich. Zur genauen Einstellung des pH-Wertes wurde dem gelösten Probenmaterial bis zum Erreichen des Ziel-pH-Wertes Natriumhydroxid zugegeben.

Pyridinolinanalyse (PYR)

Probenmaterial, Standards und Kontrollen wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit dem Analysepuffer verdünnt. Zur Inkubation, die bei 2 bis 8 °C über 3 Stunden ablief, wurden 50 µl dieser Lösungen und 100 µl Enzymkonjugat (monoklonale Pyridinolin-Antikörper) an alkalische Phosphatase gebunden und in vorbereitete, mit Pyridinolin beschichtete Mikrowellplatten pipettiert. Das Antigen (PYR) aus der Beschichtung und den Proben konkurriert um die Bindungsstellen des Enzymkonjugates. Nach dreimaligem Waschen mit einem speziellen Puffer erfolgte durch Zugabe von 150 µl Substratlösung (p-Nitrophenylphosphat in Diethanolamin- und Magnesiumchloridpufferlösung gelöst) eine zweite Inkubation über 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Enzymreaktion wurde durch 100 µl 1 N Natriumhydroxid gestoppt.

Anschließend wurde die optische Dichte bei 405 nm bestimmt. Die Pyridinolinkonzentration im Probenmaterial und in den Kontrollen wurde an-hand einer Standardkurve ermittelt. Es besteht eine indirekte Proportionalität zwischen der optischen Dichte und der Pyridinolinkonzentration.

Die Resultate wurden in nmol/l angegeben und auf der Grundlage des Trockengewichtes und des ermittelten Kollagengehaltes in den einzelnen Proben in mol Pyridinolin/mol Kollagen umgerechnet.

Deoxypyridinolinanalyse (DPD)

Analog der Pyridinolinuntersuchung erfolgte die automatisierte Analyse. Es wurden für Deoxypyridinolin (DPD) spezifische, monoklonale Antikörper, die ebenfalls an alkalische Phosphatase gebunden sind, verwendet. Die Inkubation erfolgte hier bei 37 °C. Nichtgebundene Reaktionspartner wurden mittels eines Waschvorganges entfernt. Nach Zugabe des Substrates (Adamantylidioxetanphosphatester) startete die Enzymreaktion, eine zweite Inkubation wurde über 10 Minuten durchgeführt.

Die optische Dichte wurde mittels eines Luminometers gemessen.

Die Berechnung der vom Automaten ausgegebenen Werte für DPD erfolgte analog der Berechnung für die Pyridinolinkonzentration.

6.10.3 Quantitative Kollagen-Typ I und III Bestimmung

Nach Präparation der einzelnen Strukturen wurden diese im Vakuum-Exsikkator getrocknet und anschließend zur Vorbereitung der Homogenisation mit Flüssigstickstoff zerkleinert.

Die Kollagenanalyse erfolgte modifiziert nach der Methode von LAURENT et al. (1981) und RIESLE et al. (1998).

Nach der Zerkleinerung der Transplantate wurde das Gewebe mit PBS in einem 3 ml all-glas Potter-Homogenisator homogenisiert und anschließend bei 10 000 U/min für 6 Minuten zentrifugiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurde jeweils der Überstand nach der Zentrifugation verworfen und nur der Rückstand verwendet. Das nach der Zentrifugation erhaltene Material wurde in 2 %igem SDS gelöst, ebenfalls homogenisiert und bei 10 000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, wobei dieser Vorgang viermal wiederholt wurde.

PBS wurde zur dreimalig wiederholten Extraktion verwendet. Zum Abschluss der Vorbereitung des Materials erfolgte zweimal eine Homogenisation in Anwesenheit von Azeton mit nachfolgender Zentrifugation.

Das Analysematerial wurde im Anschluss daran in einem Vakuum-Exsikkator mit Phosphor(V)-Oxid getrocknet (LAURENT et al. 1981).

Die azetongetrockneten Proben wurden in einem 3 ml all-glas Potter-Homogenisator mit 70 %iger Ameisensäure zweimal homogenisiert und in ein konisches 15 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Das Waschen des Homogenisates geschah mit 70 %iger

Ameisensäure. Das Gesamtvolumen an Ameisensäure in dem Zentrifugenröhrchen betrug 1 ml/10 mg Trocken-gewicht.

Das in Ameisensäure gelöste und homogenisierte Analysematerial wurde für 40 Minuten bei 60 °C unter ständiger Durchmischung inkubiert (RIESLE et al. 1998). Anschließend wurde Bromzyan in fester Form mit einer Konzentration von 50 mg/ml zu der aus Analysematerial und 70 %iger Ameisensäure bestehenden Lösung zugegeben. Zur Deoxygenierung setzte man dem Reaktionsgemisch Stickstoffgas zu. Die Bromzyanspaltung dauerte 20 Stunden. Während dieser Zeit wurden die Zentrifugenröhrchen zur gleich-mäßigen Durchmischung auf einem Rüttler gelagert. Gestoppt wurde die Bromzyanreaktion durch Zentrifugation bei 10 000 U/min für 20 Minuten. Die Zentrifugenröhrchen wurden unter einem Abzugschrank geöffnet und 0,25 ml des Überstandes in Eppendorfröhrchen abpipettiert und bei –20 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine zweite Bromzyanspaltung entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen mit dem nach der Zentrifugation erhaltenen Material (FAN 1997).

Nachdem die Proben bei –80 °C gefroren waren, erfolgte eine Trocknung mittels Lyophilisation.

Das lyophilisierte Material wurde mittels der SDS-Polyacrylamid-Elektro-phorese nach LAEMMLI (1970) in einzelne Peptide aufgetrennt. Dazu wurden die Proben in SDS-Probenpuffer (63 mM TrisHCl, 10 % Glycerol, 2 % SDS in 250 ml Aqua bidestillata, pH 6,8) mit 4 mg Probenmaterial/60 µl Probenpuffer gelöst.

Im Anschluss an eine Neutralisation mit 1 µl 10 N NaOH wurden die Proben mittels 10 % des Probenvolumens 50 mM DTT reduziert und zur Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 8 Minuten inkubiert.

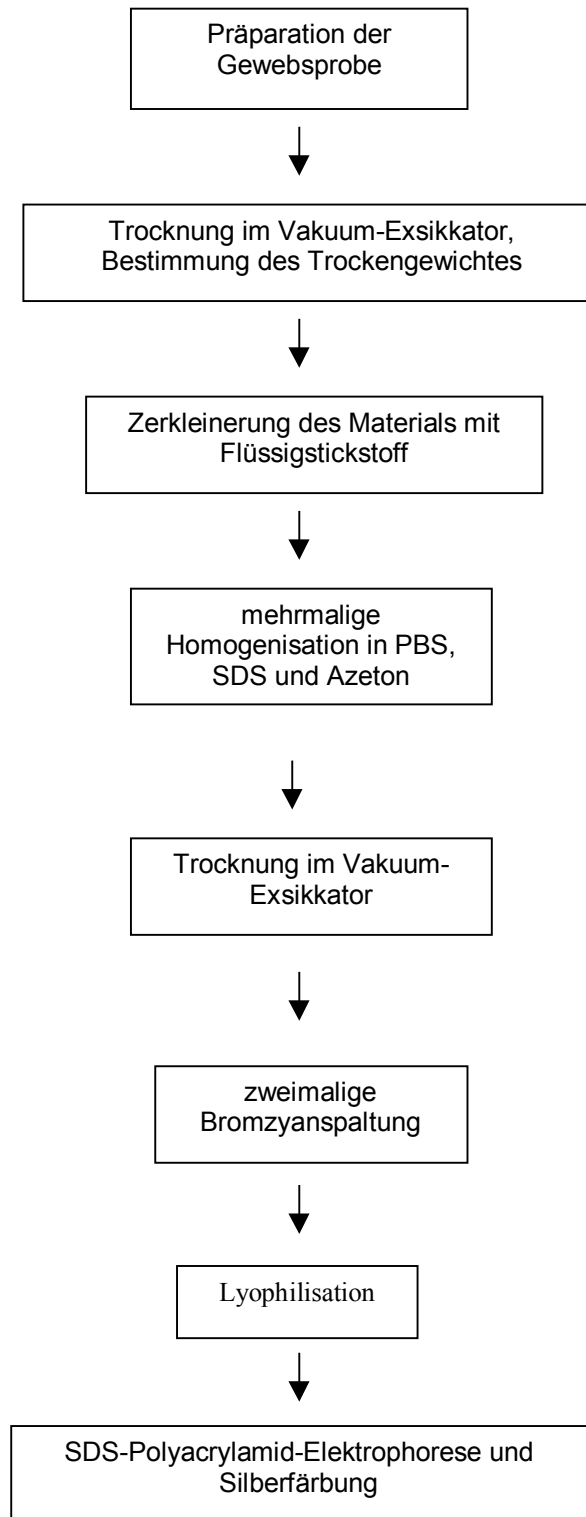


Abb. 27: Schematische Darstellung des Procedere für die Kollagentypisierung mittels Bromzyanspaltung und Elektrophorese (RIECHERT 2001)

Nach der Zentrifugation der Proben bei 10 000 U/min für 5 Minuten verwendete man nur die Überstände zur weiteren Analyse. Vor der Elektrophorese erfolgte eine zweite Verdünnung des Probenmaterials in einem Verdünnungsverhältnis von 1:160.

Die Elektrophorese erfolgte mit Vertikal-Gradientengelen und einer Stromstärke von 30 mA je Gel. Für die Elektrophorese wurde der Molekulargewichtsmarker (MultiMark™) benutzt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 5 µl. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenol Blau-Front die untere Kante des Gels erreichte.

Die Gele wurden einer Silbernitratfärbung nach BJELLQVIST et al. (1993) unterzogen, da diese 100-fach sensitiver ist als die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. Nach Entnahme der Gele wurden diese für 5 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend für zweimal 60 Minuten in einer Ethanol-Essigsäure-Wasserlösung (40:10:50) sowie über Nacht im Verhältnis 5:5:90 fixiert.

Nach dem Waschen der Gele für 5 Minuten in deionisiertem Wasser brachte man die Gele für 30 Minuten in eine Lösung aus Natriumazetat (0,5 M) und Glutaraldehyd (1 %).

Danach erfolgten Waschschrte mit dreimal 10 Minuten in deionisiertem Wasser, anschließend mit zweimal 30 Minuten in Naphthalin-1,5-disulfonsäure zur Erzielung einer gleichmäßigen Färbung des Gelhintergrundes. Zum Schluss dieses Teilschrittes wurden die Gele nochmals viermal 15 Minuten in deionisiertem Wasser gespült und danach in einer frisch hergestellten Ammoniak-Silbernitratlösung über 30 Minuten gefärbt. Vor der Entwicklung der Banden erfolgte ein wiederholtes Waschen der Gele über viermal 4 Minuten in deionisiertem Wasser. Die Entwicklung der Banden erfolgte mit einer Lösung aus Zitronensäure (0,01 % w/v) und Formaldehyd (0,1 % v/v) innerhalb von 4 Minuten und wurde mit Hilfe einer Tris (5 % w/v)-Essigsäure (2 % v/v)-Lösung gestoppt.

Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Quantity One. Dazu wurde der prozentuale Anteil der Banden der Markerpeptide für Kollagentyp I (α_1 (I) CB 7 + CB 8) und III (α_1 (III) CB3) ermittelt (AMIEL et al. 1984, AMIEL et al. 1986, FAN et al. 1997, LISTRAT et al. 1998).

6.11 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben. Bei der graphischen Darstellung wurden zusätzlich der Median in Boxplots angegeben.

Die Daten wurden vor Festlegung des Testverfahrens auf eine Abweichung von der Normalverteilung mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test geprüft. Bei kleinen Stichproben wurden zusätzlich die Abweichungen des Mittelwertes und des Medians herangezogen oder die Interpretation des Boxplots genutzt. Im Weiteren erfolgte die Prüfung auf Varianzgleichheit mit dem Levene-Test.

Bei parametrischen unabhängigen Daten erfolgte die Prüfung der Gruppenunterschiede mit einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse. Zur Identifikation der Gruppenunterschiede in Bezug auf den Beobachtungszeitpunkt und der Operationsmethode wurden a posteriori-Tests durchgeführt. Hierzu wurde der Bonferroni-Test (multipler t-Test mit Alpha-Korrektur) und der Dunnett-Test (multiple Vergleiche gegen eine Kontrollgruppe) eingesetzt.

Für nichtparametrische abhängige Daten erfolgte die Prüfung auf Gruppenunterschiede mit dem Friedman-Test und anschließend die Einzelvergleiche mit dem Wilcoxon-Test.

Bei nichtparametrischen unabhängigen Daten wurden die Gruppenunterschiede mit dem Rangsummentest nach Kruskal-Wallis durchgeführt und die Paarvergleiche mit dem t-Test nach Student durchgeführt. Sowohl für den Wilcoxon-Test als auch für den t-Test erfolgte eine zusätzliche alpha-Adjustierung nach Bonferroni (p-Wert geteilt durch Anzahl der Paarvergleiche).

Werte die unter der festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bzw. dem alpha-adjustierten Wert nach Bonferroni lagen wurden als signifikant definiert, wobei immer zweiseitig getestet wurde.

Eine Korrelationsanalyse nach Spearman wurde für die Ausrissfestigkeit und Faktor XIII-Konzentration 2, 32 und 56 Wochen postoperativ gegen verschiedene Variablen auf ihre Abhängigkeit geprüft. Die Berechnungen erfolgten nach der Primärdatenerfassung im Kalkulationsprogramm Excel 97 (Microsoft, Seattle, USA) und nach Übertragung die statistische Auswertung im Programm SPSS Version 10 (SPSS Inc. Chicago, USA) auf einem handelsüblichen Personalcomputer.

7. Experimentelle Ergebnisse

7.1 Faktor XIII-Analyse

Der Verlauf der Faktor XIII-Plasmakonzentration zeigte für die Untersuchungsgruppen und die Kontrollgruppe charakteristische Verläufe. Die Ausgangskonzentrationen sind für alle Gruppen vergleichbar und lagen zwischen 123 % und 128 %.

Am 1. postoperativen Tag kam es in den drei Operationsgruppen zum signifikanten Abfall ($p < 0,001$) des Plasmaspiegels auf Konzentrationen zwischen 85 % und 87 %. Diese Konzentrationsänderung war in allen Gruppen hochsignifikant ($p = 0,005$) verringert gegenüber den Faktor XIII-Plasmaspiegel der Kontrollgruppe.

Am 3. postoperativen Tag erhöhten sich Faktor XIII-Konzentrationen in den Gruppen B und C ($p = 0,0005$). Die erreichten Werte lagen zu diesem Zeitpunkt über den Werten der Kontrollgruppe. Der Unterschied für die Gruppe C gegenüber der Kontrollgruppe war signifikant ($p = 0,001$).

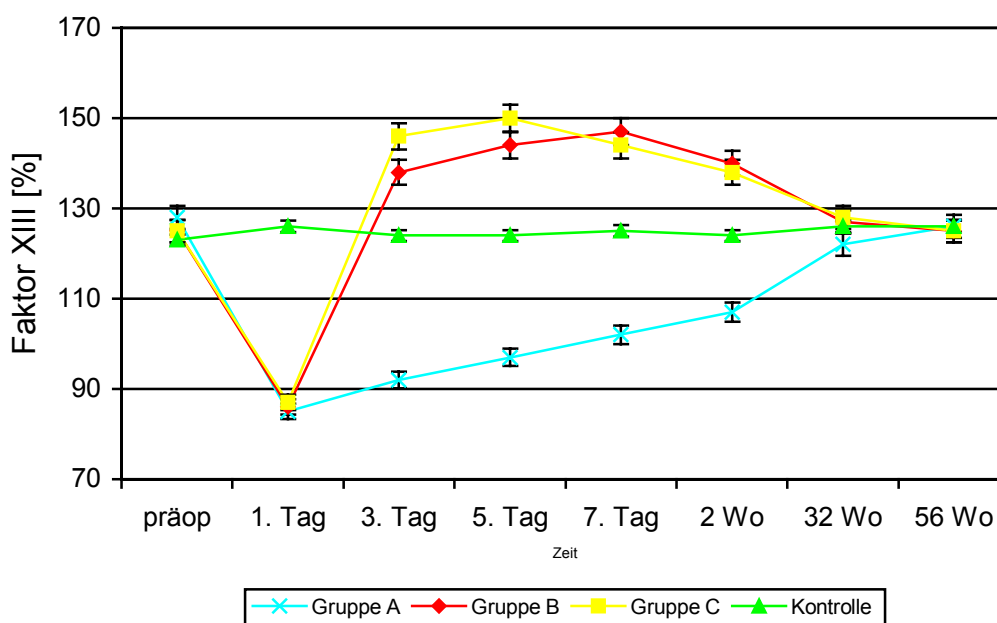


Abb. 28: Faktor XIII-Plasmakonzentration im Verlauf

Die Gruppe A zeigte gegen alle anderen Gruppen mit 92 % eine signifikant ($p < 0,001$) geringere Plasmakonzentration. Diese Faktor XIII-Konzentrationsdefizite setzten sich an den postoperativen Untersuchungstagen 5, 7 und 14 fort. Während die Plasmakonzentrationen der Gruppen B und C gleichmäßig erhöht über den Werten der Kontrollgruppe blieben, kam es in der Gruppe A zu einer langsamen Konzentrationserhöhung in diesem Zeitraum. Diese Werte waren bis zum 14. postoperativen Tag gegenüber den Versuchsgruppen B und C ($p < 0,001$) sowie der Kontrollgruppe ($p = 0,027$) weiterhin signifikant erniedrigt. Zu den Kontrolluntersuchungszeitpunkten 32 Wochen und 56 Wochen postoperativ hatten sich die Plasmakonzentrationen der Untersuchungsgruppen dem Niveau der Kontrollgruppe angeglichen und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und im Vergleich zum präoperativen Ausgangsbefund.

7.2 Makroskopische Befunde

Zum Zeitpunkt 2 Wochen postoperativ sahen die Transplantate blass gefärbt und diskret aufgefaserter aus. Die Überprüfung der Transplantatspannungen zeigten keine Lockerungen oder Unterschiede in den Operationsgruppen. Eine extrem dünne Schicht gefäßführendes synoviales Bindegewebe, welches mit dem Hoffa'schen Fettkörper kommunizierte, umhüllte die Transplantate. Es bestanden im ventralen Gelenkkompartiment diskrete Verwachsungen. Die synoviale Flüssigkeit war transparent bis dunkelgelb gefärbt. Makroskopische Zeichen von degenerativen Knorpelveränderungen wurden nicht gesehen. Qualitative makroskopische Unterschiede der Untersuchungsgruppen waren nicht zu erkennen.

Nach 32 Wochen waren die Transplantate von einer gut vaskularisierten Synovialis umgeben, der Gesamtumfang der Plastiken hatte im Vergleich zum Voruntersuchungszeitpunkt zugenommen. Die Spannungen der Transplantate wiesen keine sekundären Lockerungen auf und waren mit denen des Voruntersuchungszeitpunktes vergleichbar. Die makroskopischen Befunde nach 32 Wochen ähnelten sehr dem Aussehen des vorderen Kreuzbandes, intraartikulär waren eine typische synoviale Bedeckung, zahlreiche durchscheinende Blutgefäße und eine klare Synovialflüssigkeit sichtbar. Die bindegewebige Transplantatumhüllung war tibial stärker ausgeprägt als femoral.

Die Inspektion des Gelenkknorpels aller Kompartimente zeigte in allen Operationsgruppen initiale oberflächliche Knorpelrauigkeiten und eine Abnahme des Glanzes der hyalinen Knorpelflächen.

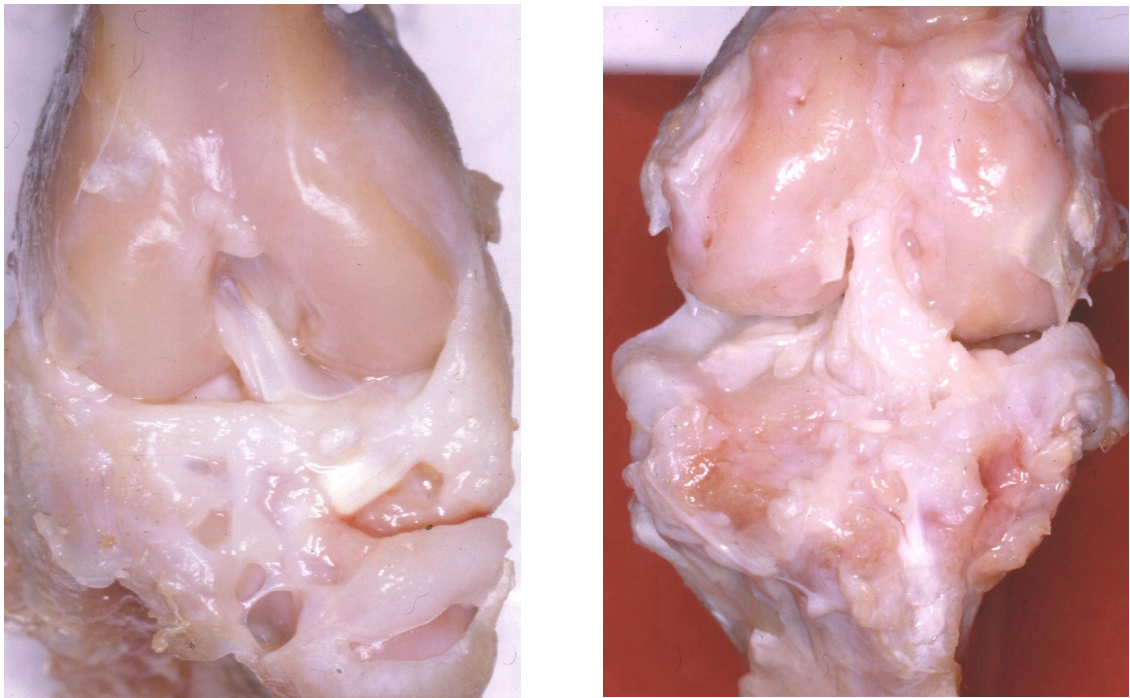


Abb. 29: a, b: Makroskopische Befunde von Kniegelenken. Links: – Kontrollkniegelenk ohne Operation 32 Wochen postoperativ; typisch glänzende Struktur des vorderen Kreuzbandes. Rechts: Kniegelenk der Gruppe B 32 Wochen postoperativ. Leicht hypertrophiertes VKB, nur geringe degenerative Veränderungen.

Zum Untersuchungszeitpunkt 56 Wochen postoperativ gab es im Vergleich zum Vorbefund 32 Wochen postoperativ keine wesentlichen Befundveränderungen. Die Transplantatspannungen hatten sich nicht verändert, die Synovialisierung zeigte ein typisches Aussehen wie bei einem vorderen Kreuzband. Als markanteste Veränderung war eine Zunahme der makroskopisch sichtbaren degenerativen Gelenkknorpelveränderungen zu beobachten. Hierbei wiesen insbesondere der retropatelläre Knorpel und das mediale Kompartment Zeichen von deutlichen oberflächlichen Fibrillationen auf.

Zwischen den Untersuchungsgruppen gab es keine quantitativ objektivierbaren Unterschiede hinsichtlich der degenerativen Veränderungen.

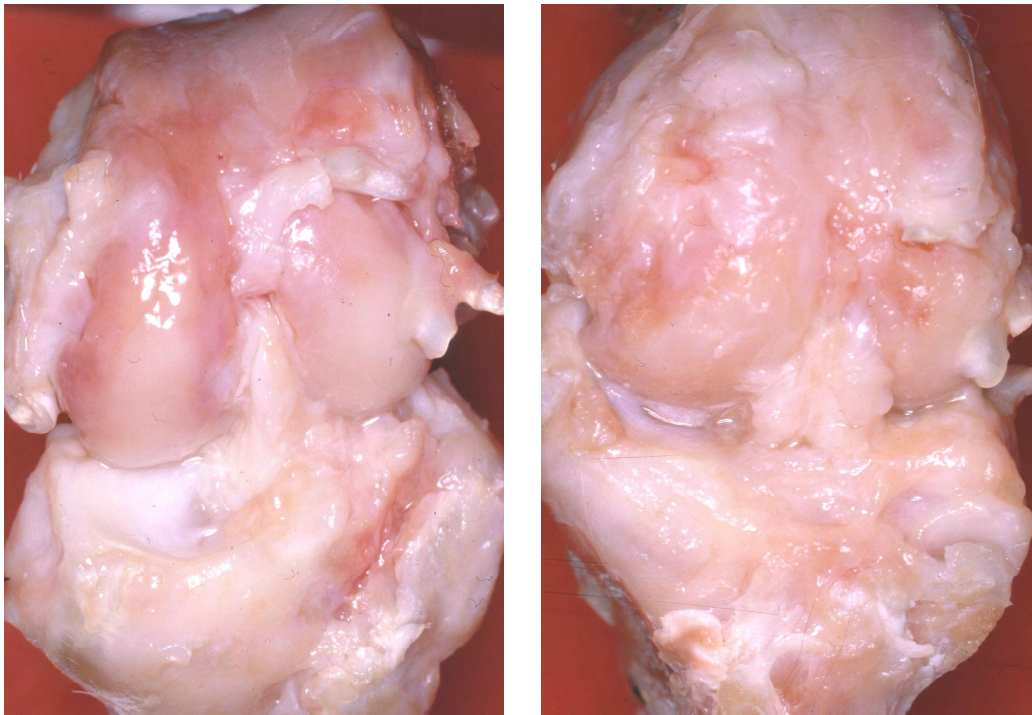


Abb. 30: a, b: Makroskopische Befunde von operierten linken Kniegelenken 56 Wochen postoperativ: Links: Gruppe A, vorderes Kreuzband füllt vollständig die Fossa intercondylica aus, mäßiggradige Femorotibialarthrose medial betont. Rechts: Kniegelenk der Gruppe C hypertrophiertes synovialisiertes vorderes Kreuzband, ausgeprägte Arthrose im femoropatellaren Gleitlager

7.3 Radiologische und histologische Osteoarthrose

Die Gelenke aller Untersuchungsgruppen zeigten 2 Wochen postoperativ sowohl tibial als auch femoral keine Zeichen osteoarthrotischer Veränderungen.

Nach 32 Wochen nahm die Knorpelschädigung der Gelenkflächen femoral und tibial signifikant ($p = 0,01$) in allen Gruppen zu. Quantitative Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht verifiziert werden. Der Medianwert des Mankin-Scores war für die Operationsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe sowohl femoral ($p = 0,01$) als auch tibial ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Femoral zeigten die Operationsgruppen signifikant ($p = 0,01$) stärkere osteoarthrotische Veränderungen als tibial.

Auch die nicht operierte Gegenseite zeigte eine Zunahme der Knorpelschädigung, die als physiologische Alterung angesehen wurde. Auf den Röntgenbilddauswertungen ist eine entsprechende Entrundung der Femurkondylen und osteophytäre Anbauten tibial zu beobachten.

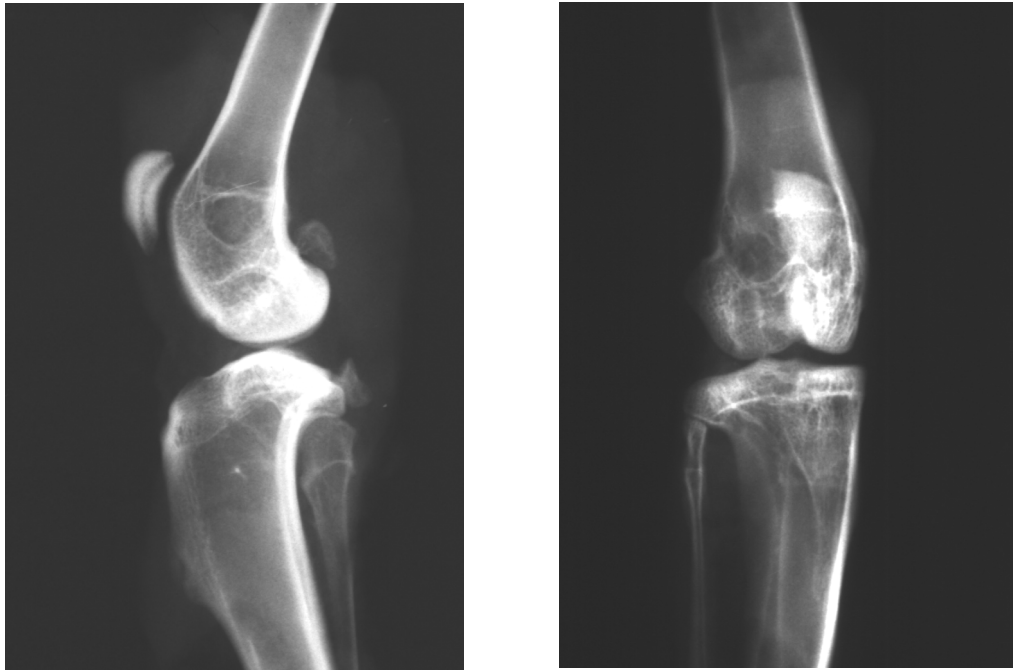


Abb. 31: . a, b: Röntgenaufnahmen des rechten Kniegelenkes in 2 Ebenen nach 56 Wochen der Kontrollgruppe (ohne Operation). Zeichen einer initialen Arthrose mit subchondraler Sklerosierung medial betont.

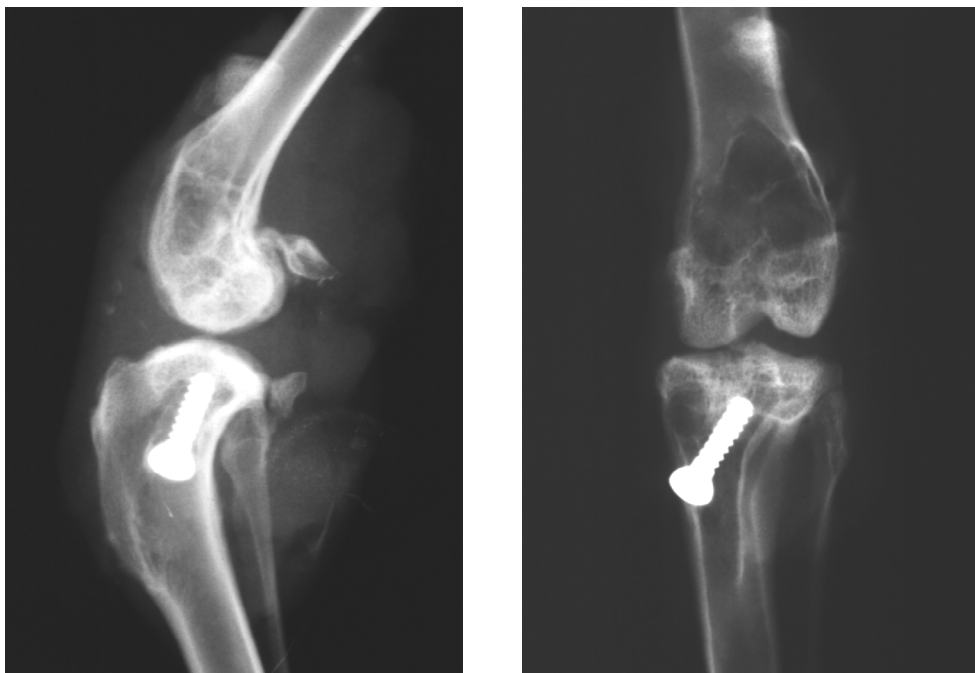


Abb. 32: a, b: Röntgenaufnahmen des linken Kniegelenkes in 2 Ebenen 32 Wochen postoperativ der Gruppe B. Arthrose mäßigen Grades des medialen Kompartiments. Patelladislokation als Komplikation.

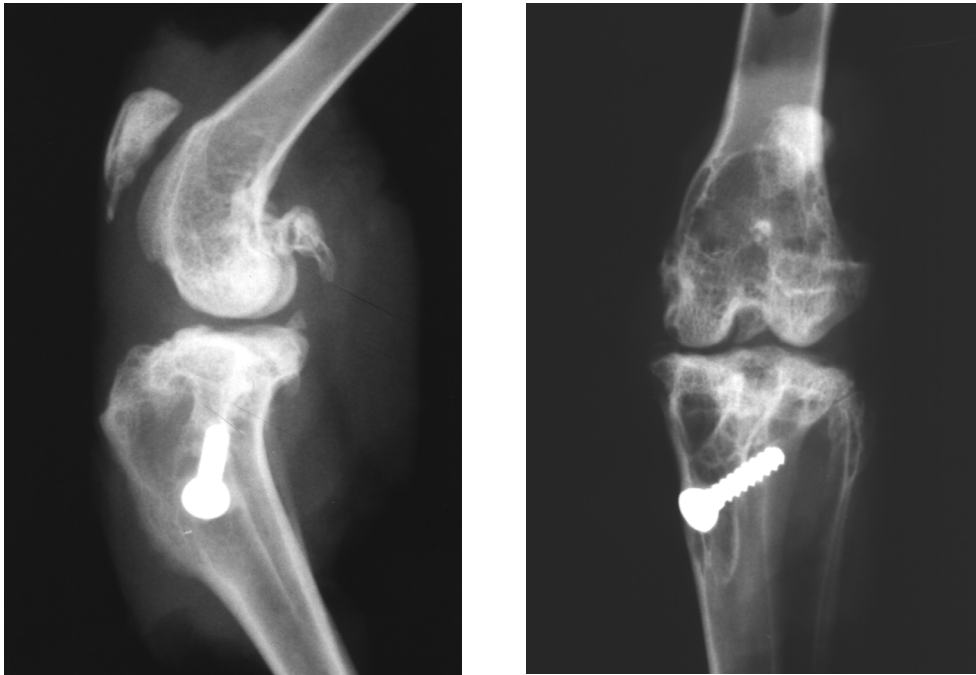


Abb. 33: a, b: Röntgenaufnahmen des linken Kniegelenkes in 2 Ebenen 56 Wochen postoperativ der Gruppe C. Kaudaler Patellaosteophyt, mäßiggradige Arthrose mediales und laterales Kompartiment. Divergierende Schraubenlage tibial mit stark sklerosiertem Bohrkanal an anatomometrischer Position.

Die degenerativen Veränderungen nach 56 Wochen setzten sich in den Operationsgruppen und der Kontrollgruppe fort. Der Anstieg des Medianwertes im Mankin-Score war femoral nur für die Gruppe C ($p = 0,05$) und tibial für die Gruppe B ($p = 0,02$) signifikant. Zwischen der Kontrollgruppe und den Operationsgruppen bestand weder femoral noch tibial ein signifikanter Unterschied in der Knorpelschädigung. Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass sich in der Langzeitbeobachtung von 56 Wochen sich die natürlichen degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels eines Kaninchens sich quantitativ nicht von denen der Operationsgruppen unterschieden.

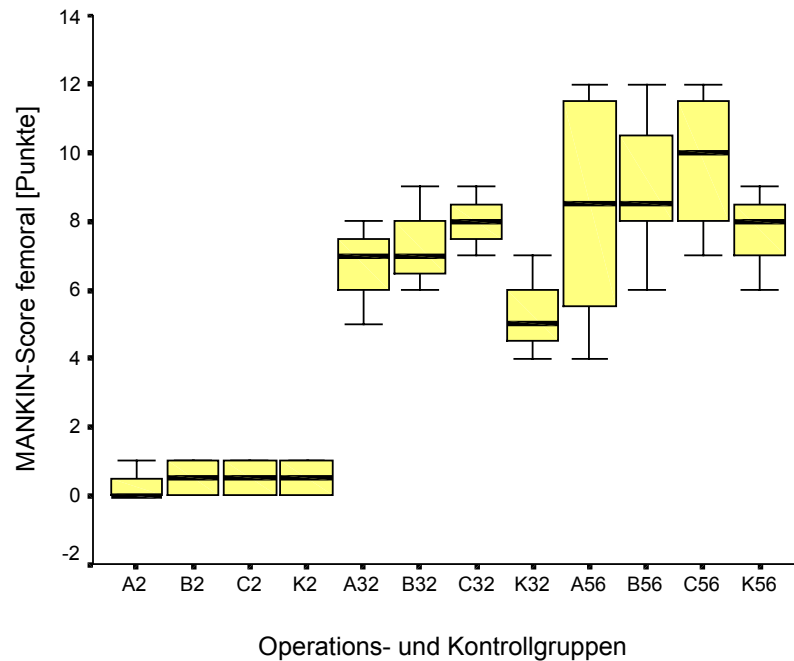


Abb. 34: Medianwerte des Mankin-Scores zur histologischen Beurteilung des femoralen Knorpelschadens der Operationsgruppen (A, B, C) und Kontrollgruppe (K) zu den entsprechenden Beobachtungszeiten 2, 32 und 56 Wochen postoperativ .

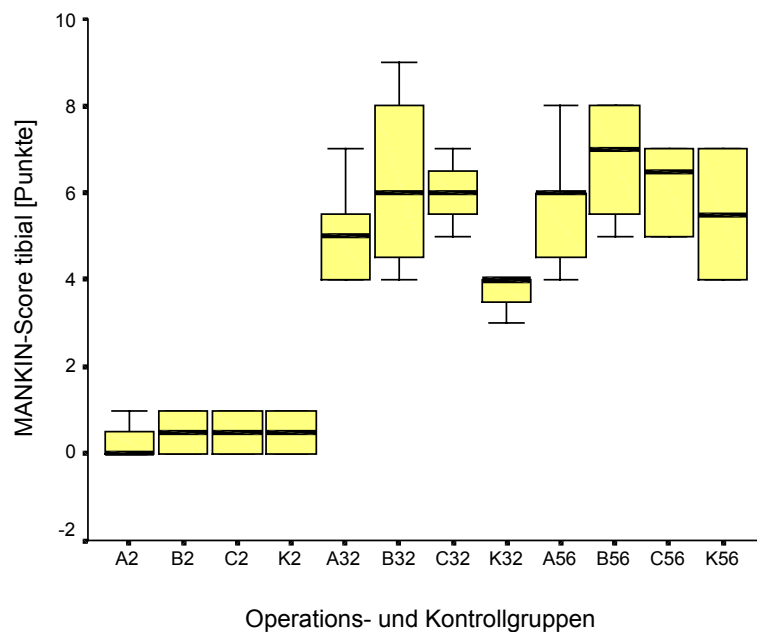


Abb. 35: Medianwerte des Mankin-Scores zur histologischen Beurteilung des tibialen Knorpelschadens der Operationsgruppen (A, B, C) und Kontrollgruppe (K) zu den entsprechenden Beobachtungszeiten 2, 32 und 56 Wochen postoperativ.

7.4 Histologie und Histomorphometrie

2 Wochen postoperativ imponierte das autogene Transplantat durch ein nekrotisches und lytisches Aussehen. Insbesondere in den zentralen Abschnitten überwogen avaskuläre, azelluläre und nekrobiotisch umgewandelte Bereiche mit teilweiser Fragmentation und Strukturverlust der Kollagenfaserbündel. Die Kollagenfaserbündel besaßen keine strenge Orientierung, der zentrale Bereich war zum Teil völlig azellulär, peripher konnten vereinzelt vitale Zellen mit ovoider Form gesehen werden. Eine Migration von proliferierenden Zellen der Synovialis in die peripheren Abschnitte des Bandes war zu erkennen. Insbesondere um kleine Gefäße konnte man Zellanhäufungen finden. Von diesen Gefäßen breiteten sich die Zellen in die kollagene Matrix aus. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Rundzellen wurden nur vereinzelt perivaskulär gesehen. Die zum Operationszeitpunkt gesplitteten Transplantate der Gruppe C zeigten deutlich mehr Entzündungs- und Reparaturzellen als die Vergleichsgruppen.

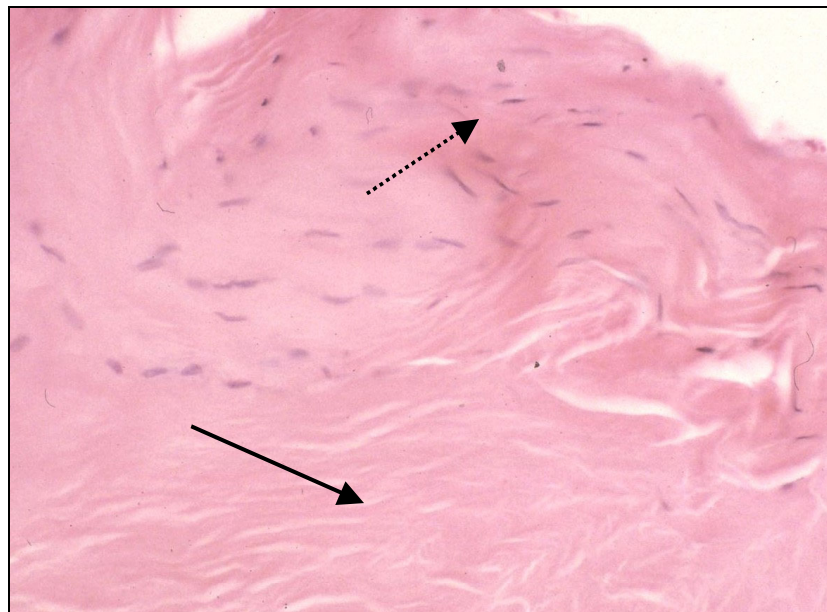


Abb. 36: Histologischer Ausschnitt 2 Wochen postoperativ: Gruppe B vereinzelt sind in der Peripherie vitale Fibrozyten zu erkennen (gestrichelter Pfeil), zentral (geschlossener Pfeil) sind völlig azelluläre Bereiche. (H & E, 50 x)

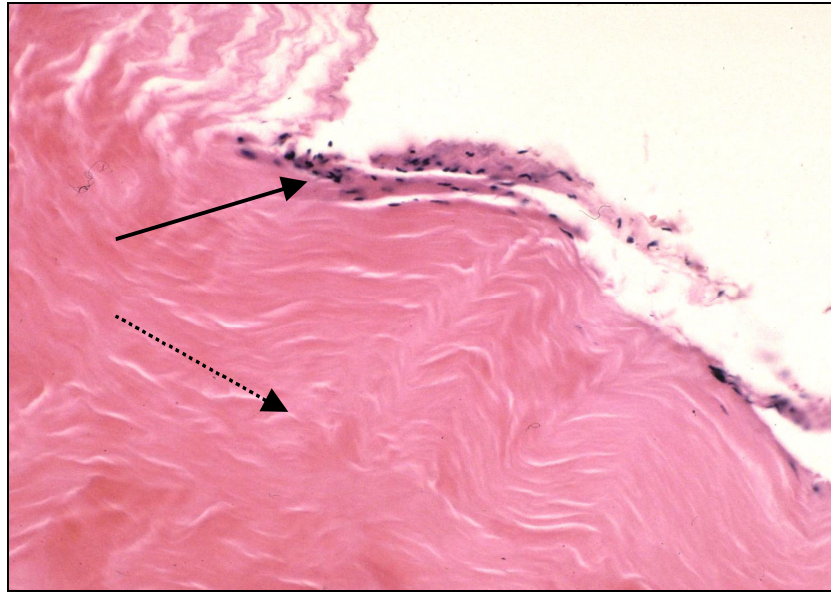


Abb. 37: Histologischer Ausschnitt 2 Wochen postoperativ: Gruppe A in der Peripherie sind keine Zellen sichtbar, nur Anteile einer initialen Synovialisierung (geschlossener Pfeil) sind erkennbar. Die strukturelle Organisation der kollagenen Fasern (gestrichelter Pfeil) ist nicht vollständig desorganisiert. (H & E, 50 x)

Die ossäre Integration der Knochen-Transplantat-Knochen-Komplexe muss femoral und tibial separat betrachtet werden. Während femoral der Knochenblock mit der sogenannten direkten Sehneninsertion in press-fit Technik gelenknah abschließt, ist tibial die Transplantatfixation prinzipiell anders aufgebaut (siehe Abb.: 38).

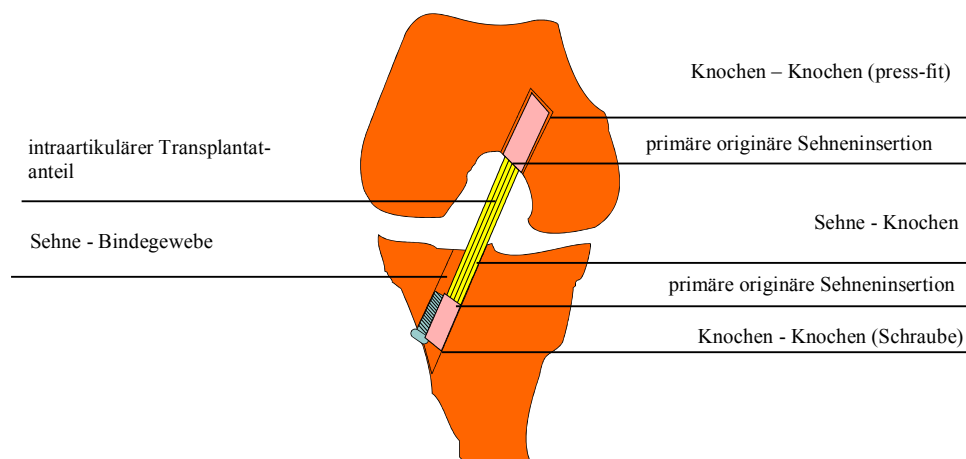


Abb. 38: Schemazeichnung des Transplantatverlaufes und der Kontaktflächen

Ein Teil des tibialen Transplantates liegt im Knochenkanal, der Knochenblock mit der originären direkten Sehneninsertion ist gelenkfern über eine Interferenzschraube distal befestigt. Aus diesem Grund entsteht tibial eine Region, in der Transplantatanteile am Knochen liegen während auf der gegenüberliegenden Seite ein Hohlraum zwischen Transplantat und Bohrkanalwand entsteht.

Femoral zeigten die Osteozyten der Knochenblöcke 2 Wochen postoperativ teilweise Verkleinerungen und nekrotische Veränderungen, wobei gleich-zeitig Osteoklasten und Osteoblasten zu erkennen waren. Die Transplantate der Gruppe B und C hatten eine stärkere appositionelle periphere Knochen-formation als in der Gruppe A. Die Knochenblockinkorporation war zu diesem Zeitpunkt für alle Gruppen nicht abgeschlossen. In der Übersichts-lichtmikroskopie ließ sich eine dichtere Spongiosaarchitektur in der Nähe des Knochenblockes erkennen.

Tibial stellte sich der Bohrkanal unverschlossen gelenknah dar. Zwischen der Bohrkanalwand und dem Kreuzbandtransplantat war der Kanal mit nicht organisiertem Bindegewebe gefüllt. Eine Kavität durch Eintritt von Synovialflüssigkeit wurde nicht beobachtet. Der Transplantat-Knochen-Bereich zeigte zwischen Sehne und Knochen eine dünne Schicht fibröses Bindegewebe mit Fibroblasten und Entzündungszellen. Der Sehnenanteil entsprach in seinem morphologischen Aufbau dem intraartikulären Transplantatanteil. Der distale Knochenblock lag dicht an der Bohrkanalwand an und die strukturellen Veränderungen entsprachen der femoralen Knochenblockintegration. Eine vollständige knöcherne Integration wurde auch hier zu diesem Untersuchungszeitpunkt nicht gefunden.

Im intraartikulären Transplantatanteil hatte sich die Zellzahl im Vergleich zum Ausgangssubstrat der Patellarsehne histomorphometrisch in allen Gruppen geringfügig erhöht. Die höchste Zellularität zeigten die Transplantate der Gruppe C. Innerhalb der Versuchsgruppen B und C ($p = 0,024$) sowie A und C ($p = 0,004$) waren die Zellzahlunterschiede signifikant.

Die mediane Gefäßanschnittsfläche zeigte für alle Transplantate eine geringfügige Zunahme gegenüber dem Patellarsehnentransplantat. In den Gruppen B ($p = 0,022$) und C ($p < 0,0005$) wurden signifikant mehr Gefäßanschnitte morphometriert als in der Gruppe A.

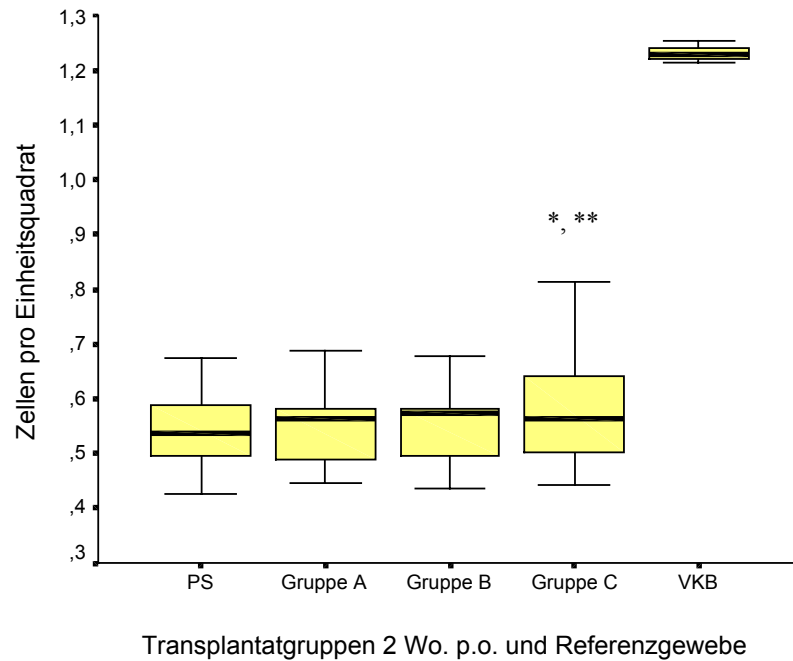


Abb. 39: Mediane Zellzahl im Einheitsquadrat der Operationsgruppen 2 Wochen post-operativ und Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband), * $p = 0,024$ gegenüber Gruppe B und ** $p = 0,004$ gegenüber Gruppe A)

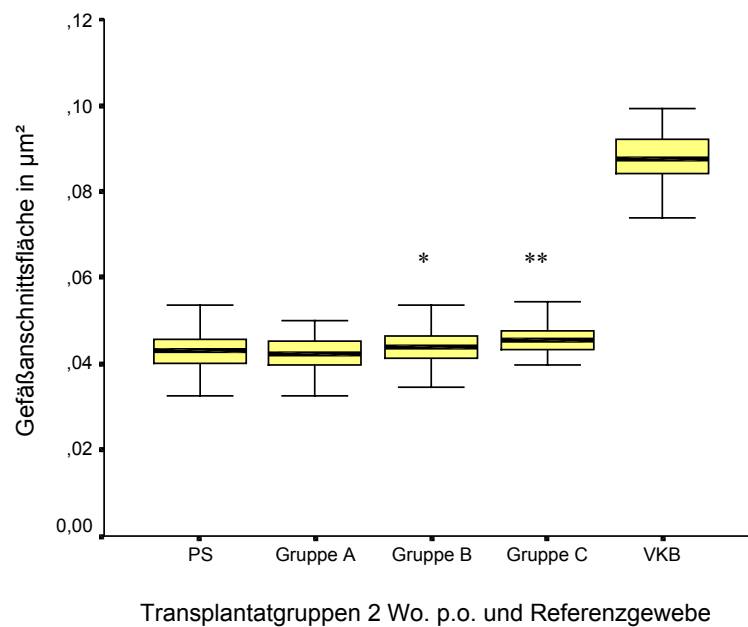


Abb. 40: Mediane Gefäßanschnittsfläche der Operationsgruppen 2 Wochen postoperativ und der Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband), * $p = 0,022$ gegenüber Gruppe A und ** $p < 0,0005$ gegenüber Gruppe A.

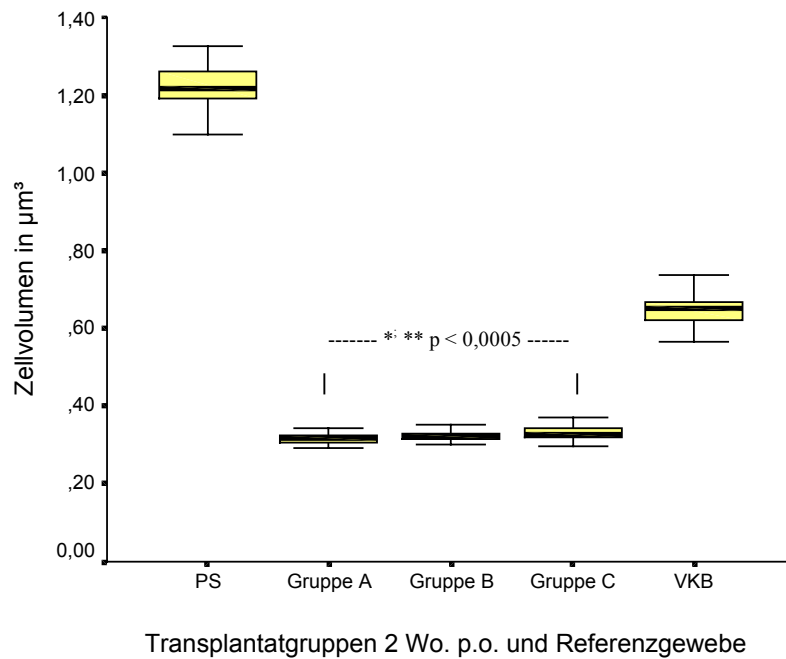


Abb. 41: Medianes Zellvolumen der Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und der Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband), * und ** jeweils signifikant ($p = 0,0005$) verringert gegenüber PS und VKB

Der Medianwert des Zellvolumens reduzierte sich in allen Operationsgruppen signifikant ($p < 0,0005$) zu dem Wert der Patellarsehne und lag für alle Gruppen signifikant unter dem medianen Zellvolumen des vorderen Kreuzbandes ($p < 0,0005$). Die Gruppe C hatte das größte und die Gruppe A das geringste Zellvolumen. Die Gruppen unterschieden sich im Gruppenvergleich hinsichtlich des medianen Zellvolumens nicht signifikant.

32 Wochen postoperativ waren Form und Größe der Zellen der Transplantate denen des vorderen Kreuzbandes ähnlich. Die Zellen entsprachen in ihrem Aufbau überwiegend den Fibrozyten. In der Längsachse konnte in einigen Schnitten ein "crimping"-Muster beobachtet werden. Zwischen den Kollagen-faserbündeln wurden vereinzelt Regionen mit Gefügestörungen und teils mit Strukturverlusten gesehen. Auch einzelne fleckförmige Zellproliferationen um Kapillaren deuteten auf eine noch anhaltende reparative Aktivität hin.

Die femorale Knochenintegration war abgeschlossen und ließ sich nicht mehr von dem Empfängerknochen unterscheiden. Tibial dagegen wurden zwei verschiedene Insertionsmechanismen beobachtet. Gelenknah war der Bohrkanal mit dichtem Bindegewebe gefüllt und zwischen dem Transplantat und dem Knochen der Bohrkanalwand wurde eine indirekte Sehneninsertion mit typischer Ausbildung von Sharpey-ähnlichen Fasern beobachtet. Distal war der Knochenblock vollständig knöchern integriert und ließ sich nicht mehr von der Spongiosa des Umgebungsknochen differenzieren. Morphologische Unterschiede hinsichtlich der tibialen und femoralen ossären Integration zwischen den Operationsgruppen konnten nicht objektiviert werden.

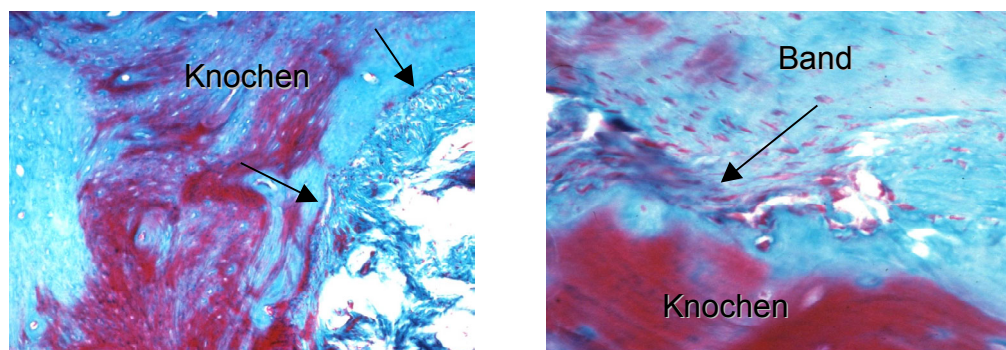


Abb. 42: a, b: Histologische Schnitte durch den proximalen tibialen Bohrkanal 32 Wochen postoperativ, jeweils Gruppe B. Links: Lockeres Bindegewebe befindet sich an der Bohrkanalwand (Pfeil). Rechts: Angedeutete Sharpey'sche Fasern (Pfeil) zwischen Band und Knochenwand. (Masson-Goldner links 40 x, rechts 50 x)

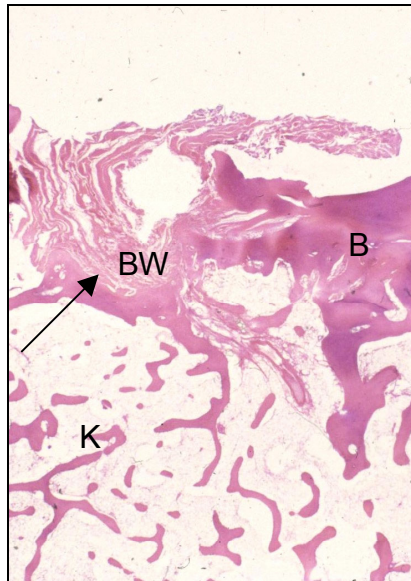


Abb. 43: Histologischer Ausschnitt aus der tibialen Insertion 32 Wochen postoperativ der Gruppe C. Im proximalen Eingangsbereich befindet sich straffes kollagenes Bandgewebe (direkte Insertion) und zwischen dem Band und Knochenkanal lockeres dichtes Bindegewebe (indirekte Insertion) (H & E, 2 x); K – Knochen, B – Band, BW – Bindegewebe, Pfeil – Knochenkanalwand

Im intraartikulären Transplantatanteil nahmen histomorphometrisch bis zur 32. postoperativen Woche die Zellzahl, die Gefäßanschnittsfläche und das Zellvolumen in allen Gruppen signifikant ($p < 0,0005$) im Vergleich zum Voruntersuchungszeitpunkt zu.

Die höchste Zellularität hatte die Gruppe C, signifikant weniger Zellen wurden in Gruppe A ($p < 0,0005$) und Gruppe B ($p < 0,0005$) beobachtet. Die Gruppe A hatte auch signifikant weniger Zellen als die Gruppe B ($p = 0,047$).

Die stärkste Vaskularisation hatte ebenfalls die Gruppe C. Die Gruppen A und B hatten eine signifikant ($p < 0,0005$) geringere mediane Gefäßanschnittsfläche.

Die größeren Zellvolumina hatten dagegen die Gruppen A und B, dieser Volumenunterschied war im Vergleich zur Gruppe C hochsignifikant ($p < 0,0005$) größer.

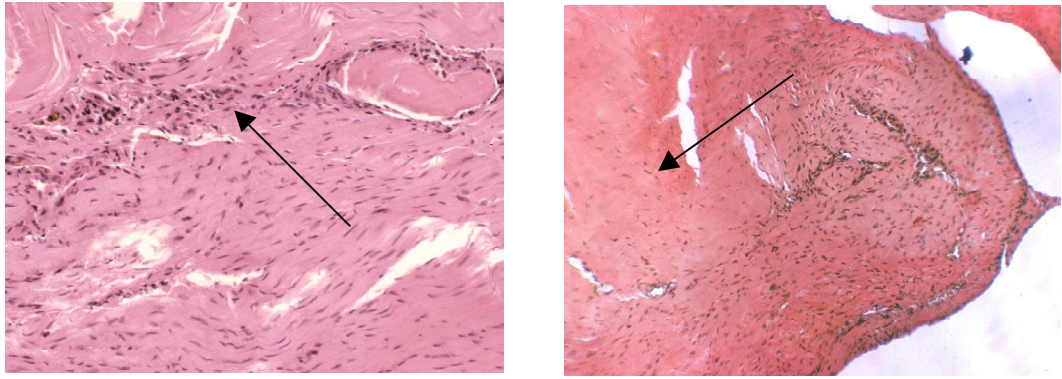


Abb. 44: a, b: Transplantatausschnitte 32 Wochen postoperativ: Links – Gruppe B mit starker Hypervaskularisierung und Hyperzellularität. Insbesondere perivaskuläre Zellanhäufungen (Pfeil) (H&E, 50x); Rechts – Gruppe A Ausschnitt aus der Peripherie. Die Zellen sind nicht so stark in die zentralen Anteile infiltriert. In den zentralen Arealen befinden sich noch azelluläre Bereiche (Pfeil) (von Gieson, 40x)

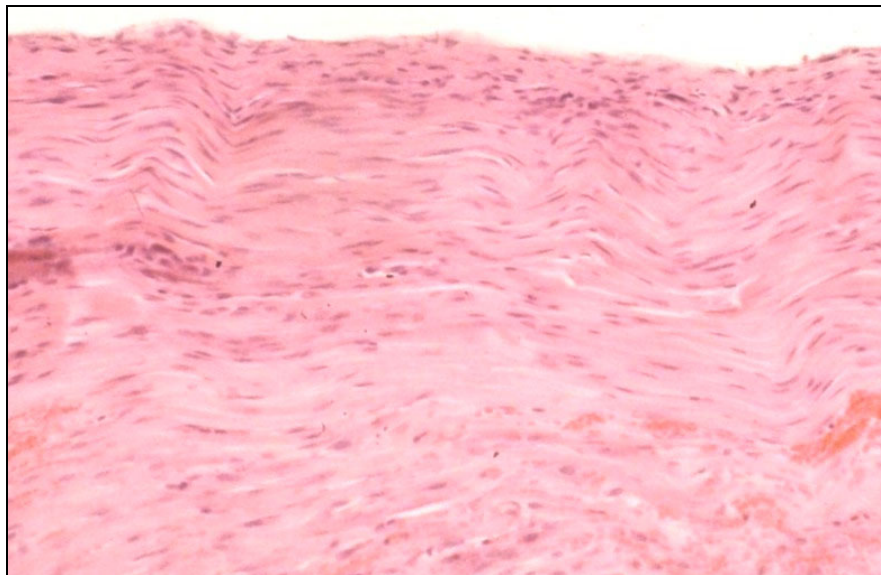


Abb. 45: Ausschnitt eines Präparates 32 Wochen postoperativ der Gruppe C mit stärkerer Hyperzellularität und längsausgerichteten Kollagenfibrillen. Die Zellvolumina sind kleiner als in Gruppe A und B und nehmen eine spindelförmige Gestalt an. Es sind keine nekrotischen Areale mehr erkennbar. (H & E, 50 x)

56 Wochen postoperativ zeigte die Übersichtlichtmikroskopie keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Operationsgruppen. Die Kollagen-fasern hatten eine gleichmäßige Längsausrichtung. Zellproliferationsareale wurden nur noch vereinzelt beobachtet. Die Zellen waren zwischen den Faseranteilen dicht gepackt und kolumnenartig angeordnet.

Die femorale ossäre Integration der Transplantate zeigte keine Befund-veränderungen im Vergleich zur 32. postoperativen Woche. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Insertion zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen war. Tibial waren im Bohrkanal keine Sehnenanteile mehr erkennbar. Die zum Zeitpunkt 32 Wochen postoperativ deutlich differenzierte Insertion im Bereich des Sehnen-Knochen-Überganges konnte nicht mehr erkannt werden. Die Spongiosaarchitektur des Tibiakopfes hatte eine dichtere Organisation in der Region des ehemaligen Bohrkanals mit alleinigem Sehnenanteil. Weiter distal im Bereich des Knochenblockes war keine morphologische Differenzierung zwischen Transplantatknochenblock und Empfängerknochen sichtbar. Es ist davon auszugehen, dass tibial im Bereich des gelenknahen Knochenkanals im Zeitverlauf ein Übergang von der indirekten Sehneninsertion zur vollständigen knöchernen Integration im Sinne einer direkten Sehneninsertion stattfindet und dieser Prozess sich auch nach der 32. postoperativen Woche fortsetzt.

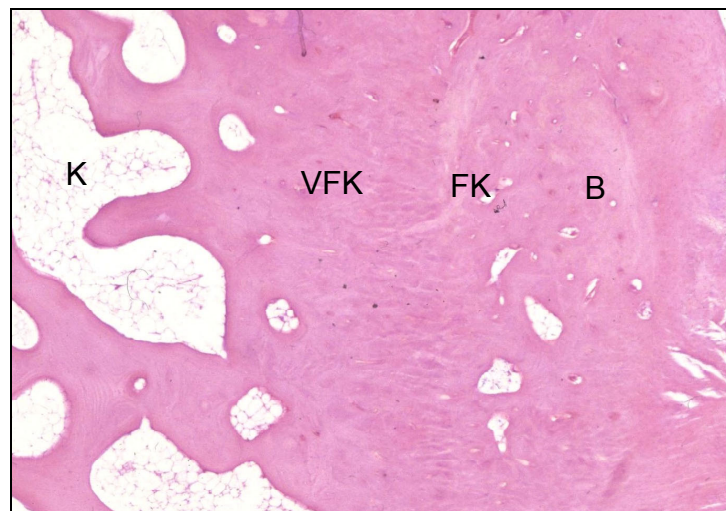


Abb. 46: Histologischer Ausschnitt aus einer femoralen Insertion 56 Wochen postoperativ der Gruppe C. Typischen Aufbau in 4 Zonen: B - Band, FK - unverkalkter Faserknorpel, VFK - verkalkter Faserknorpel, K - Knochen (H & E, 2 x)

Die immersionslichtmikroskopische Analyse bei 1000-facher Vergrößerung demaskierte persistierende Unterschiede in der intraartikulären Transplantatmorphologie.

Im Zeitintervall zwischen der 32. und 56. postoperativen Woche verringerten sich in allen Operationsgruppen die Medianwerte der Zellularität, der Gefäß-anschnittsflächen und des Zellvolumens signifikant ($p < 0,0005$).

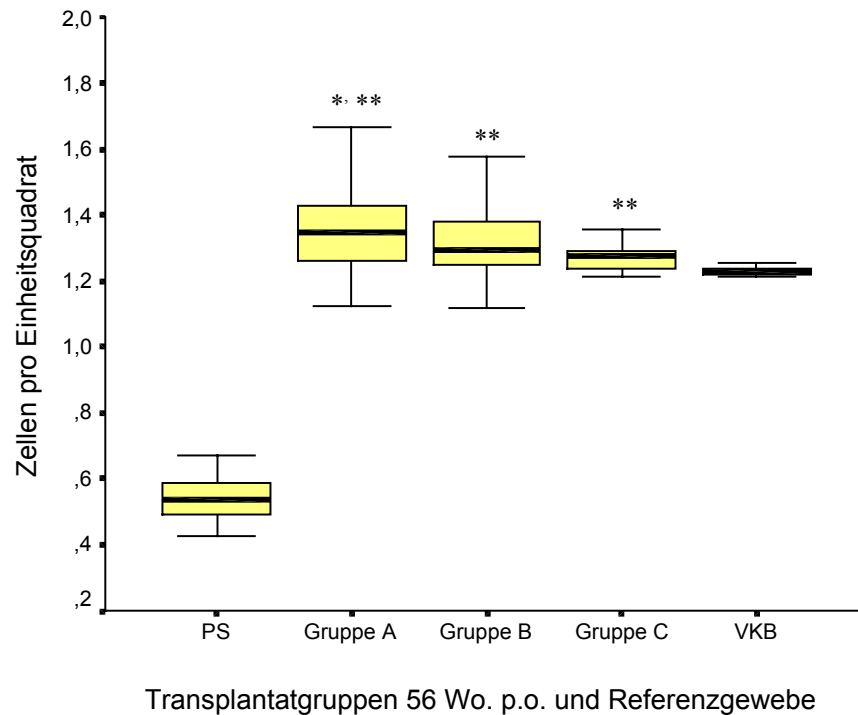


Abb. 47: Mediane Zellzahl im Einheitsquadrat der Operationsgruppen 56 Wochen post-operativ und Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband), * $p < 0,05$ gegenüber Gruppe B und C, ** $p < 0,05$ gegenüber dem VKB

Die Abbildung verdeutlicht die zellulären Unterschiede zwischen dem Ausgangssubstrat der Patellarsehne, den Operationsgruppen 56 Wochen nach der Operation und dem anatomischen vorderen Kreuzband.

Aus Voruntersuchungen war bereits bekannt, dass zwischen der Patellarsehne und dem vorderen Kreuzband signifikante Unterschiede ($p = 0,001$) in Bezug auf die Zellularität bestehen.

Die Transplantate zeigten 56 Wochen nach der Operation etwa eine doppelt so hohe Zellularität als das Ausgangssubstrat. Diese quantitativen Unterschiede waren für alle Transplantationsgruppen signifikant ($p < 0,0005$).

Die Gruppe A hatte die höchste Zellzahl in den Transplantaten. Dieser Unterschied war gegenüber den Vergleichsgruppen B und C signifikant ($p < 0,05$). Die Gruppen B und C wiesen eine Ähnlichkeit hinsichtlich der Zellularität auf.

Die höchste Annäherung an die Zellularität des vorderen Kreuzbandes hatte die Gruppe C. Alle Transplantatgruppen zeigten im Vergleich zum vorderen Kreuzband eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Zellularität auf.

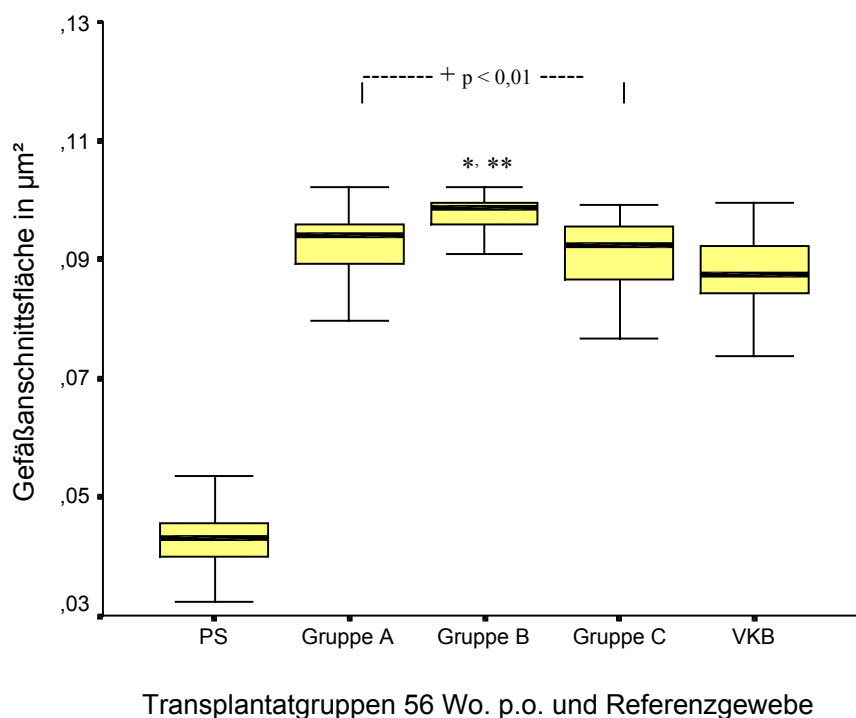


Abb. 48: Mediane Gefäßanschnittsfläche der Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und der Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband), * $p = 0,01$ gegenüber Gruppe A, ** $p = 0,002$ gegenüber Gruppe C, + $p < 0,01$ jeweils alle Gruppen gegenüber dem VKB

In dieser Abbildung wird ebenfalls deutlich, welche Unterschiede hinsichtlich der Vaskularität zwischen den Transplantat- und Referenzgeweben bestehen.

Die Patellarsehne zeigt sowohl gegenüber dem vorderen Kreuzband ($p < 0,005$) als auch gegenüber den Transplantaten der Operationsgruppen ($p < 0,0001$) signifikant weniger Gefäßanschnitte.

56 Wochen nach der Transplantation zeigten die höchsten Gefäßanschnittsflächen die Gruppen A und B. Dabei hatte die Gruppe B gegenüber den Transplantaten der Gruppe A ($p = 0,01$) und C ($p = 0,002$) signifikant mehr Gefäßanschnitte.

Im Vergleich zum vorderen Kreuzband hatten alle Transplantationsgruppen signifikant ($p < 0,01$) höhere Gefäßanschnittsflächen. Die größte Annäherung an das vordere Kreuzband hatten die Transplantate der Gruppe C.

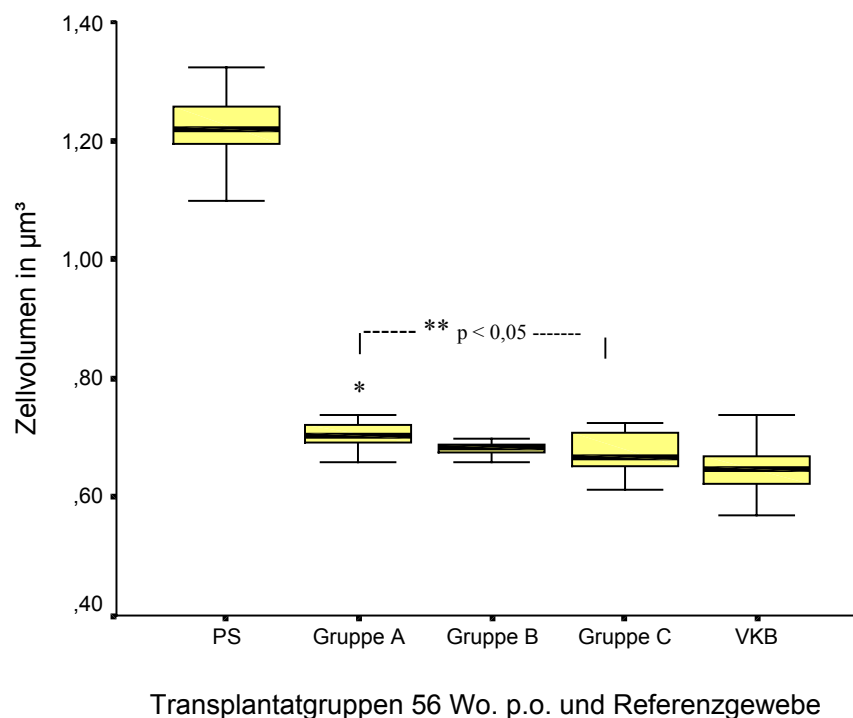


Abb. 49: Medianes Zellvolumen der Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und der Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband), * $p = 0,01$ gegenüber Gruppe B und C, ** $p < 0,05$ aller Transplantatgruppen gegenüber VKB

Die Zellvolumina der Zellen der Patellarsehne waren im Vergleich zu den Transplantaten ($p < 0,001$) und dem vorderen Kreuzband ($p = 0,002$) signifikant größer. Innerhalb der Transplante der Operationsgruppen zeigten die größten Zellvolumina die Gruppe A. Dieser Unterschied war sowohl gegenüber der Gruppe B als auch der Gruppe C signifikant ($p = 0,01$).

Der Vergleich zu den Zellvolumina des vorderen Kreuzbandes und denen der Transplantationsgruppen zeigte ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) größere Werte für die Transplantationsgruppen.

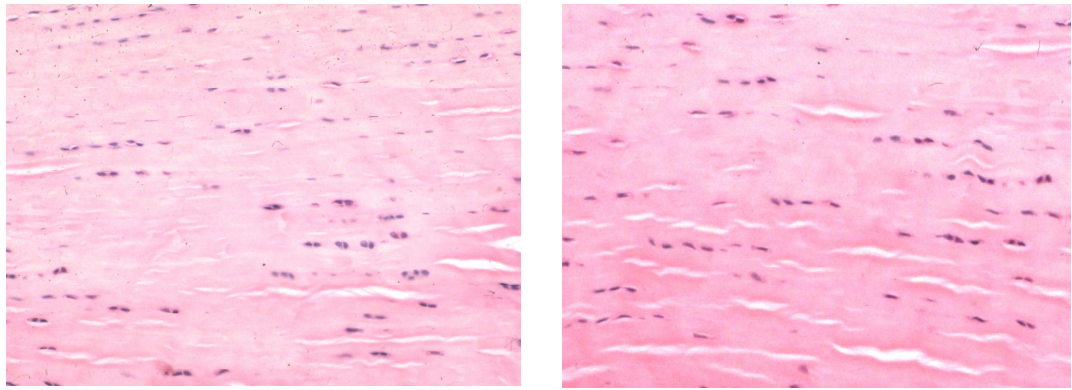


Abb. 50: a, b: Links: Ausschnitt aus einem vorderen Kreuzbandtransplantat der Gruppe B 56 Wochen postoperativ. Die Zellen sind kolumnenartig angeordnet und in Paaren gehäuft. Eine typische Wellenstruktur ist nicht zu erkennen. Rechts: Vorderes Kreuzband, ein „crimping“-Muster ist angedeutet. Die Zellen sind scheinbar kleiner. Eine lichtmikroskopische Ähnlichkeit beider Gewebe ist vorhanden. Erst die histomorphometrische Analyse demaskierte signifikante Unterschiede der Zellzahl, der Gefäßanschnittsflächen und der Zellvolumina. (H & E, 50 x)

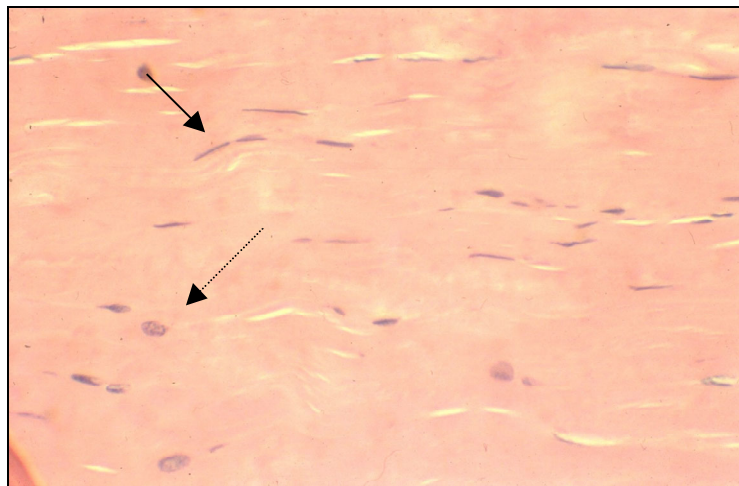


Abb. 51: Detailausschnitt aus einem vorderen Kreuzbandtransplantat der Gruppe C 56 Wochen postoperativ. Zarte Fibrozyten (geschlossener Pfeil) dicht gepackt zwischen den Kollagenfasern liegen neben einigen vereinzelt syntheseaktiven Fibroblasten (gestrichelter Pfeil). (H & E, 100 x)

Zusammenfassend konnte ermittelt werden, dass die Transplantate der Operationsgruppen in den morphometrierten Parametern Zellzahl, Gefäßanschnittsfläche und Zellvolumen signifikant höhere Werte hatten als das vordere Kreuzband. Innerhalb der Gruppen gab es zum Teil statistische Unterschiede, wobei die Transplantate der Gruppe C die höchste Annäherung in den histomorphometrischen Parametern an das vordere Kreuzband aufwiesen.

7.5 Kollagenfibrillenmorphometrie

Die elektronenmikroskopische Analyse der Kollagenfibrillen zeigte zwischen dem Patellarsehnentransplantat und dem vorderen Kreuzband hochsignifikante Unterschiede in der numerischen Dichte ($p = 0,002$), der prozentualen Flächendichte ($p = 0,001$) und dem medianen Kollagen-fibrillendurchmesser ($p < 0,0005$).

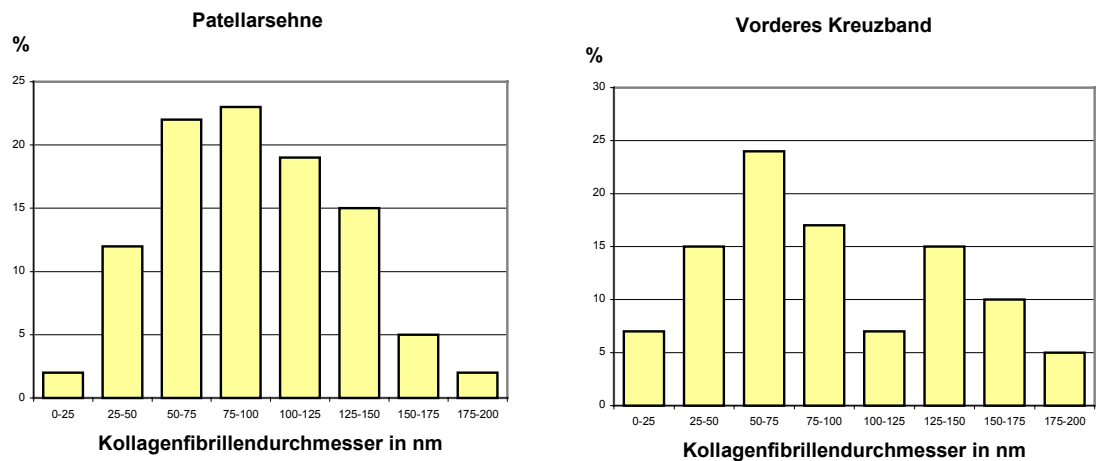


Abb. 52: a, b: Kollagenfibrillenmorphometrie der Referenzgewebe. Verteilungsmuster im 25 nm Intervall. Links: Typische unimodale Verteilung für die Patellarsehne. Rechts: bimodale Verteilung des vorderen Kreuzandes.

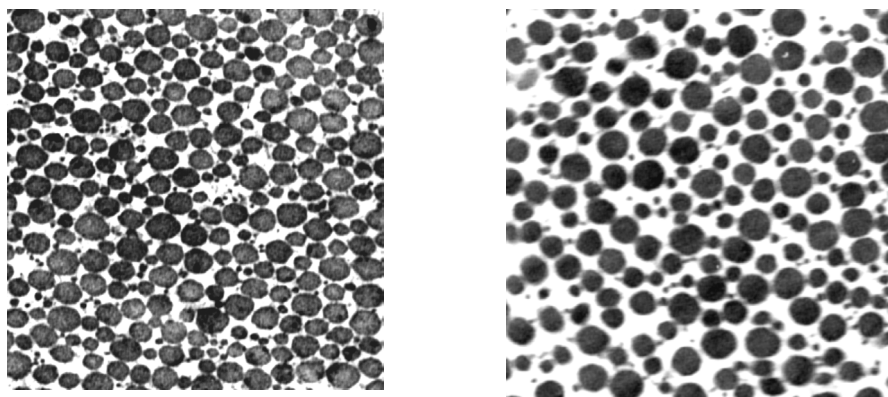


Abb. 53: a, b: Elektronenmikroskopische Bilder von Kollagenfibrillenquerschnitten (18000 x). Links: Patellarsehne mit überwiegend großen Kollagenfibrillen und einer hohen numerischen Dichte. Rechts: Vorderes Kreuzband mit typischer bimodaler Verteilung.

Die Verteilung der Kollagenfibrillen zeigte eine breite typische Gaussche Normalverteilung mit einen Peak zwischen 75 – 100 nm für die Patellar-sehne.

Beim vorderen Kreuzband wurde eine bimodale Verteilung der Kollagen-fibrillen gefunden. Es bestand ein höherer Peak zwischen 50 – 75 nm und ein zweiter, jedoch weitaus geringerer, bei 125 – 150 nm.

Zwei Wochen postoperativ hatten sich in allen Operationsgruppen Form und Verteilung der Kollagenfibrillen deutlich verändert. Die numerische Dichte und der Median der Kollagenfibrillendurchmesser verringerte sich in allen Gruppen ($p < 0,001$). Zwischen den Operationsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Kollagenfibrillenverteilung ging zu einer uni-modalen Verteilung in Richtung der dünneren Kollagenfibrillen. Die Tabelle 14 zeigt einen Überblick aller ermittelten Einzeldaten.

Tab. 14: Kollagenfibrillenmorphometrie 2 Wochen postoperativ. (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband); # $p < 0,001$; * $p = 0,001$, § $p = 0,002$, † $p < 0,0005$ jeweils im Vergleich zur Patellarsehne

	PS	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	VKB
Faseranschnittsfläche (μm^2)	5,30	4,38	4,29	4,34	3,33
Flächendichte (%)	45,35	41,6	45,9	45,2	30,6 *
numerische Dichte (μm^{-3})	84,23	69,3 #	64,3 #	66,6 #	32,2 §
medianer Durchmesser (nm)	117,3	51,2 #	52,7 #	53,8 #	63,5 †
Min – Max (nm)	23 - 200	20 - 182	9 - 185	12 - 189	20 - 183

Im weiteren Verlauf bis zur 32. postoperativen Woche traten keine markanten Veränderungen auf. Die Kollagenfibrillenverteilung in den Transplantaten war weiterhin unimodal, wobei sich der mediane Kollagenfibrillendurchmesser verringerte. Die erreichten Werte lagen hochsignifikant ($p < 0,001$) unter denen der Referenzgewebe. Die Gruppe C hatte innerhalb des Operations-gruppenvergleiches gegenüber den Gruppe A und B einen signifikant ($p = 0,02$) höheren Fibrillendurchmesser.

Tab. 15: Kollagenfibrillenmorphometrie 32 Wochen postoperativ. (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband) # $p < 0,001$; * $p = 0,001$, § $p = 0,002$, † $p < 0,0005$ jeweils im Vergleich zur Patellarsehne, ‡ $p < 0,001$ im Vergleich zu Patellarsehne und vorderem Kreuzband, & $p < 0,05$ im Vergleich zu Gruppe A und B.

	PS	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	VKB
Faseranschnittsfläche (μm^2)	5,30	4,26	4,17	4,24	3,33
Flächendichte (%)	45,35	61,3	60,9	55,2	30,6 *
numerische Dichte (μm^{-3})	84,23	57,9	55,7	56,6	32,2 §
medianer Durchmesser (nm)	117,3	42,2 ‡	42,9 ‡	51,8 ‡, &	63,5 †
Min – Max (nm)	23 - 198	18 - 162	20 - 175	24 - 182	20 - 183

56 Wochen postoperativ überwogen in den Kreuzbandtransplantaten weiter-hin zahlreiche dünne Kollagenfibrillen. Es bestand eine Linksverschiebung in Richtung der dünnen Kollagenfibrillendurchmesser. Die Flächendichten und die Faseranschnittsflächen reduzierten sich weiter, während die Kollagenfibrillendurchmesser der einzelnen Gruppen zunahmen. Die signifikant ($p < 0,01$) größten Fibrillen fanden sich in Gruppe C.

Der Vergleich der Daten mit dem vorderen Kreuzband zeigte für alle Operationsgruppen signifikant ($p < 0,01$) dünnere Kollagenfibrillen im Medianwert.

Die dünnen Kollagenfibrillen waren sehr dicht gepackt, was eine höhere prozentuale Flächen- und numerische Dichte der Transplantate belegte.

Die Verteilung der Kollagenfasern zwischen Referenzgeweben (PS, VKB) und Transplantaten divergierte erheblich. Der prozentuale Anteil der Fibrillen mit einem Durchmesser unter 75 nm betrug für die Patellarsehne 36 %, für das vordere Kreuzband 47 %, für die Transplantate der Gruppe A 75 %, der Gruppe B 63 % und der Gruppe C 71 %. Der Vergleich innerhalb der Transplantationsgruppen zeigte für die Gruppe A den höchsten Anteil an Kollagenfibrillen bis 25 nm, demgegenüber lag der Peak der Gruppen B und C zwischen 25-50 nm.

Tab. 16: Kollagenfibrillenmorphometrie 56 Wochen postoperativ. (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband)) # $p < 0,001$; § $p = 0,002$, † $p < 0,0005$ jeweils im Vergleich zur Patellarsehne, ‡ $p = 0,01$ gegenüber Gruppe A – C, & $p < 0,05$ im Vergleich zu Gruppe A und B.

	PS	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	VKB
Faseranschnittsfläche (μm^2)	5,30	4,02	3,96	4,04	3,33
Flächendichte (%)	45,35	42,3	40,9	38,2	30,6 #
numerische Dichte (μm^{-3})	84,23	41,8	46,7	43,6	32,2 §
medianer Durchmesser (nm)	117,3	40,2	46,9	51,8 &	63,5 †, ‡
Min – Max (nm)	23 - 198	15 – 175	22 - 185	20 - 192	20 - 183

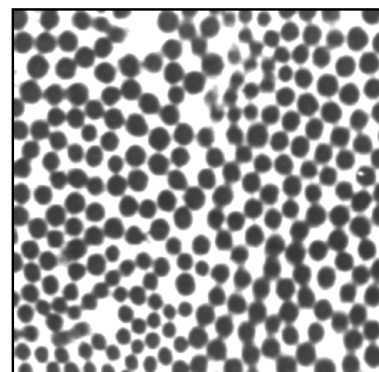
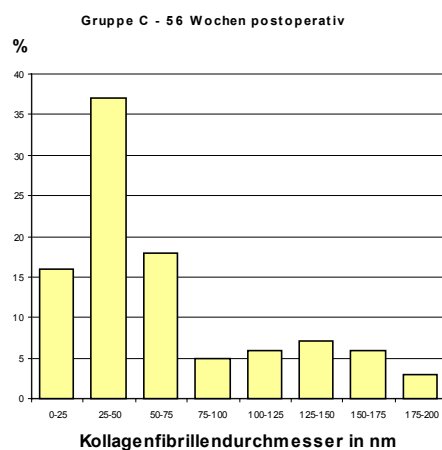
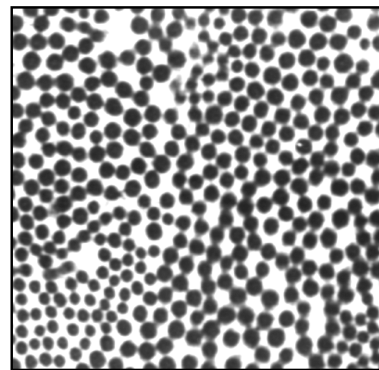
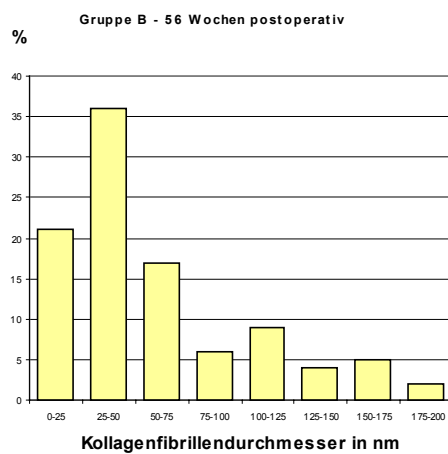
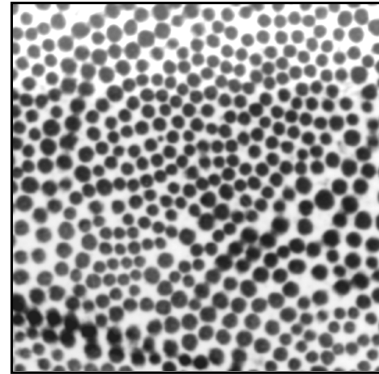
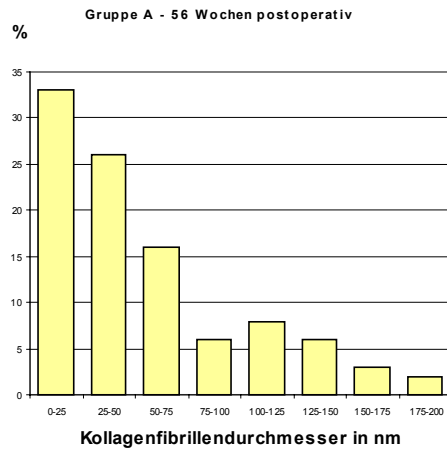


Abb. 54, Abb. 55, Abb. 56 a, b: Verteilung der Kollagenfibrillen in den Transplantaten 56 Wo. p.o. der Operationsgruppen A - C und korrespondierend elektronenmikroskopische Bilder der Kollagenfibrillenquerschnitte (18000 x)

7.6 Gesamtkollagengehalt

Die Berechnung des Gesamtkollagengehaltes beruht auf der Grundlage der Resultate der Hydroxyprolinanalyse.

2 Wochen postoperativ hatte die Gruppe C den höchsten prozentualen Kollagengehalt. Die Höhe des Kollagengehaltes entsprach dem der Patellar-sehne. Dagegen waren die Werte der Gruppe A ($p < 0,001$) und der Gruppe B ($p = 0,044$) sowohl gegenüber den Werten der Gruppe C als auch gegenüber dem Kollagengehalt der Patellarsehne verringert. Bezogen auf den Kollagengehalt des vorderen Kreuzbandes zeigten die Gruppe C und die Patellarsehne eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Konzentration.

Im zeitlichen Verlauf zum Nachuntersuchungszeitpunkt 32 Wochen postoperativ verringerten sich in allen Gruppen die Kollagenkonzentrationen ohne signifikante Unterschiede.

32 Wochen postoperativ hatte weiterhin die Gruppe C mit 72,3 % gegenüber der Gruppe A ($p = 0,006$) und der Gruppe B ($p = 0,009$) die höchste Kollagenkonzentration. Die Werte der Gruppen A ($p = 0,001$) und B ($p = 0,001$) waren gegenüber der Patellarsehne signifikant erniedrigt. Im Vergleich des Kollagengehaltes des vorderen Kreuzbandes wurde für alle Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt.

In der Verlaufsbeobachtung bis zur 56. Woche postoperativ trat eine Er-höhung des Kollagengehaltes der Gruppe B und eine Verringerung des Kollagengehaltes in den Gruppen A und C auf. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant.

56 Wochen nach der Transplantation war der höchste Kollagengehalt in der Gruppe B und der niedrigste in der Gruppe A nachzuweisen. Der Vergleich innerhalb der Operationsgruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Lediglich der Vergleich der Werte der Gruppe A gegenüber der Patellarsehne hatte eine signifikante Differenz ($p = 0,006$). Zwischen dem vorderen Kreuzband und den Transplantaten existierten keine signifikanten Unterschiede im Gesamtkollagengehalt.

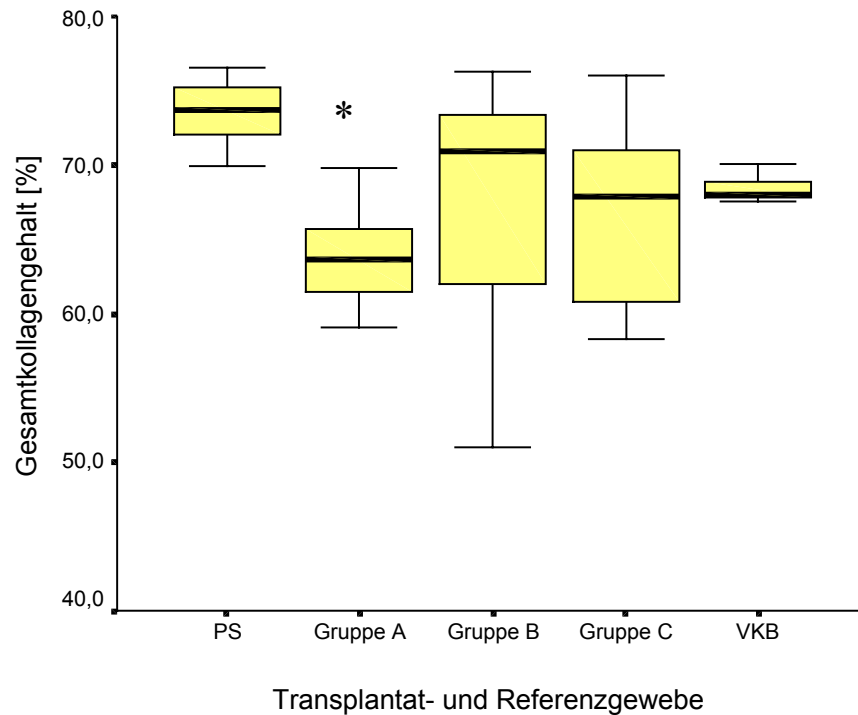


Abb. 57: Vergleich des prozentualen Gesamtkollagengehaltes 56 Wochen postoperativ der Operationsgruppen und der Referenzgruppen (PS - Patellarsehne und VKB - vorderes Kreuzband) * $p = 0,006$ gegenüber der Patellarsehne

7.7 Pyridinolin und Deoxypyridinolin

Die aus dem ELISA-Test ermittelten Werte werden in nmol/l angegeben. Auf der Grundlage der enthaltenen Trockengewichte und Verdünnungsvolumina wurde die Konzentration der nichtreduzierbaren Quervernetzungen auf ein Mol Kollagen bezogen. Dazu wurde für Kollagen ein Molekulargewicht von 300 000 D angenommen (EYRE et al. 1984).

Pyridinolin

2 Wochen nach der Transplantation verringerten sich die Pyridinolin-konzentrationen in allen Gruppen signifikant ($p < 0,001$). Die höchste Konzentration hatte die Gruppe A, gefolgt von den Werten der Gruppen B und C. Hierbei war der Unterschied zwischen den Gruppen A und C signifikant ($p < 0,001$).

Im weiteren Verlauf stiegen die Pyridinolinkonzentrationen um mehr als das 20-fache bis zur 32. postoperativen Woche an. Die Unterschiede für die Konzentrationserhöhungen in den Gruppen waren entsprechend hochsignifikant ($p < 0,001$).

32 Wochen postoperativ fand sich in Gruppe C die höchste Pyridinolinkonzentration. Zwischen den Gruppen gab es zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Alle Werte lagen im Bereich zwischen 0,54 – 0,63 mol/mol Kollagen.

Bis zur 56. postoperativen Woche zeigte sich in allen Gruppen ein leichter Anstieg der Pyridinolinwerte. Diese Erhöhungen waren jedoch nicht signifikant.

56 Wochen postoperativ wurden die höchsten Werte wiederum für die Gruppe C ermittelt. Innerhalb der Vergleichsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Pyridinolinkonzentrationen lagen auch 56 Wochen nach der Transplantation unter den Konzentrationen des vorderen Kreuzbandes. Eine signifikante Differenz ($p = 0,012$) wurde für die Gruppe A gefunden.

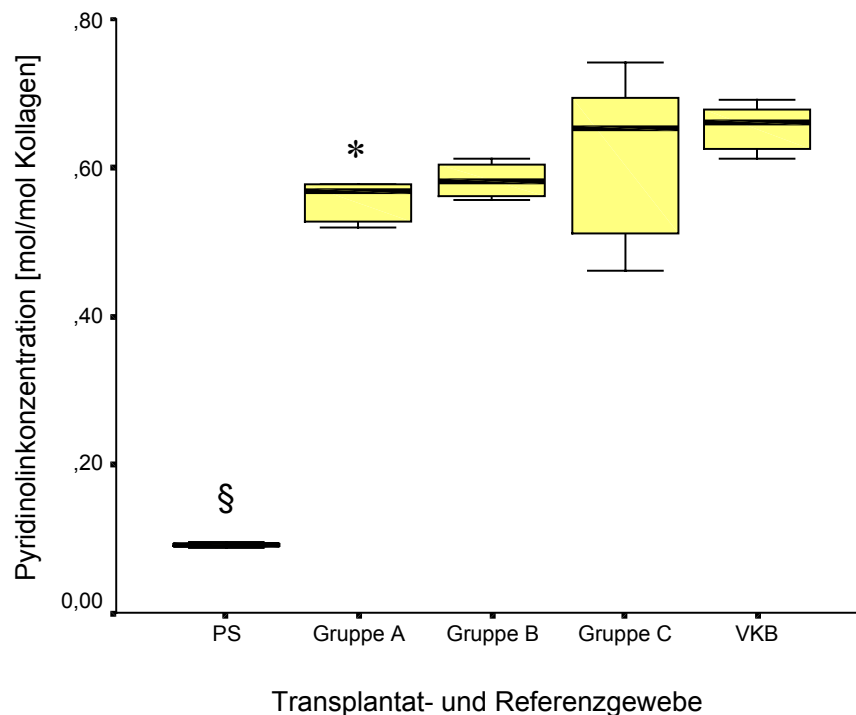


Abb. 58: Vergleichende Übersicht der Pyridinolinkonzentrationen der Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und der Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband) * $p = 0,012$ gegenüber dem vorderen Kreuzband, § $p < 0,0001$ gegenüber Gruppe A-C und dem VKB.

Deoxypyridinolin

2 Wochen postoperativ erhöhten sich in allen Gruppen die Deoxypyridinolkonzentrationen im Vergleich zur Ausgangskonzentration der Patellarsehne. Diese Erhöhung war für alle Gruppen nicht signifikant.

Die Deoxypyridinolkonzentration zeigte auch innerhalb der Vergleichs-gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Im weiteren Verlauf kam es zu einem Konzentrationsabfall für Deoxy-pyridinolin und die Werte waren im Vergleich 2 zu 32 Wochen postoperativ für alle Gruppen signifikant ($p < 0,001$) verringert. Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Alle Werte lagen im Bereich zwischen 0,038 – 0,048 mol/mol Kollagen wobei der höchste Wert für die Gruppe B ermittelt wurde.

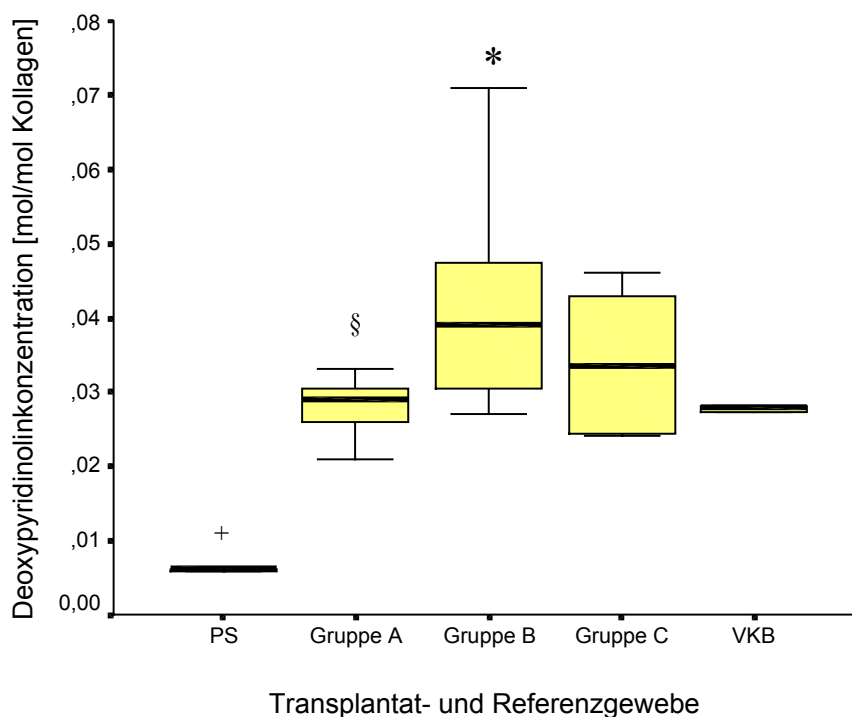


Abb. 59: Vergleichende Übersicht der Deoxypyridinolkonzentrationen der Operations-gruppen 56 Wochen postoperativ und der Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband) * $p = 0,012$ gegenüber dem vorderen Kreuzband., § $p = 0,017$ gegenüber Gruppe B, + $p < 0,0001$ gegenüber Gruppe A-C und VKB

Bis zum Ende der Beobachtungszeit 56 Wochen postoperativ verringerten sich die Deoxypyridinolkonzentrationen weiter. 56 Wochen postoperativ

wurden die geringsten Konzentrationen in der Gruppe A und die höchsten Konzentrationen in der Gruppe B gemessen. Zwischen der Gruppe A und B bestand zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Differenz ($p = 0,017$).

In allen Versuchsgruppen lagen die Deoxypyridinolkonzentrationen höher als im vorderen Kreuzband, wobei lediglich für die Gruppe B eine signifikante ($p = 0,012$) Erhöhung vorlag.

Die relativen Konzentrationsverhältnisse der nichtreduzierbaren Quervernetzungen in Operationsgruppen und Referenzgewebe (PS, VKB) sind in der Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 17: Übersicht der Ratio der nichtreduzierbaren Quervernetzungen von den Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und den Referenzgewebe (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband) (PYR – Pyridinolin, DPD – Deoxypyridinolin)

	PS	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	VKB
PYR	0,09	0,56	0,61	0,65	0,66
DPD	0,006	0,032	0,034	0,033	0,027
PYR/DPD	15	17,5	17,9	19,6	24,4

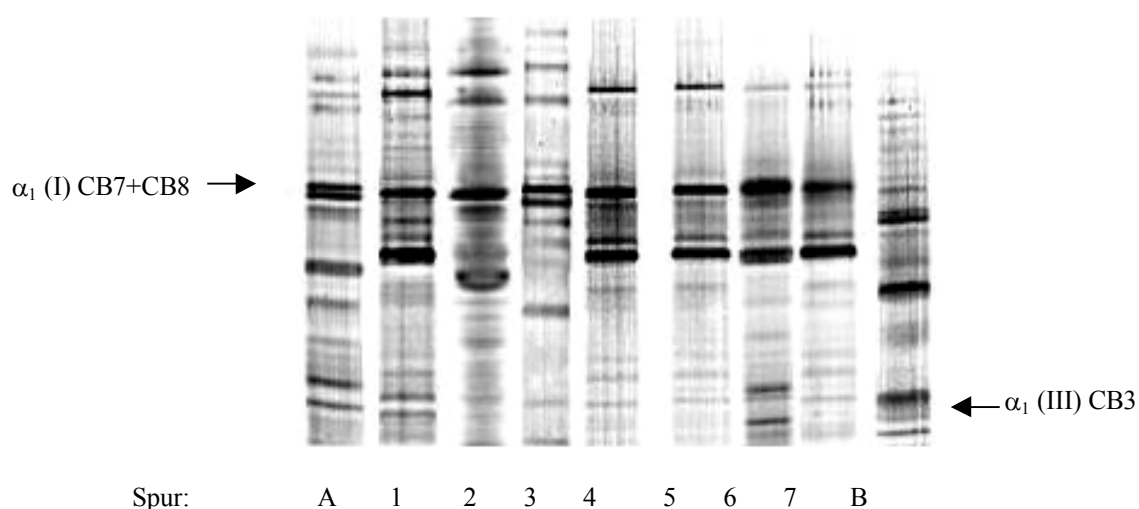
Aus den Verhältnissen der nichtreduzierbaren Quervernetzungen wird ersichtlich, dass die geringste Ratio für die Patellarsehne besteht. Die Untersuchungsgruppen besitzen höhere Werte als die Patellarsehne. Der höchste Wert wurde für die Gruppe C ermittelt, dieser hat damit die größte Annäherung an das vordere Kreuzband.

7.8 Kollagentypisierung

Die einzelnen Transplantate und Gewebe weisen ein charakteristisches Verteilungsmuster der Kollagen-Typen I und III auf, die einen weiteren Parameter zur Charakterisierung der Transplantateigenschaften darstellen.

Zunächst wurden in Vorversuchen entsprechende Standards für Sehnen und Bänder erarbeitet (RIECHERT 2001).

Die prozentualen Anteile der beiden Kollagentypen wurden anhand der optischen Dichte der Banden elektrophoretisch aufgetrennter CNBr-Marker-peptide in den untersuchten Proben im Vergleich zu denen der Standards bestimmt.



Legende:

α_1 (I) CB7+CB8 = Markerpeptid für Kollagentyp I (MG 24 und 25 kDa);

α_1 (III) CB3 = Markerpeptid für Kollagentyp III (MG 7 kDa).

Abb. 60: Elektrophoretisch aufgetrennte Bromzyanpeptide der Kollagen Typen I und III in reinen Kollagenstandards I und III und in Sehnen und Bändern

Material in den einzelnen Gelspuren: A = Kollagenstandard I; 1 = laterales Seitenband; 2 = mediales Seitenband; 3 = vorderes Kreuzband; 4 = hinteres Kreuzband, 5 = Patellarsehne; 6 = Semitendinosussehne; 7 = Achillessehne, B = Kollagenstandard III

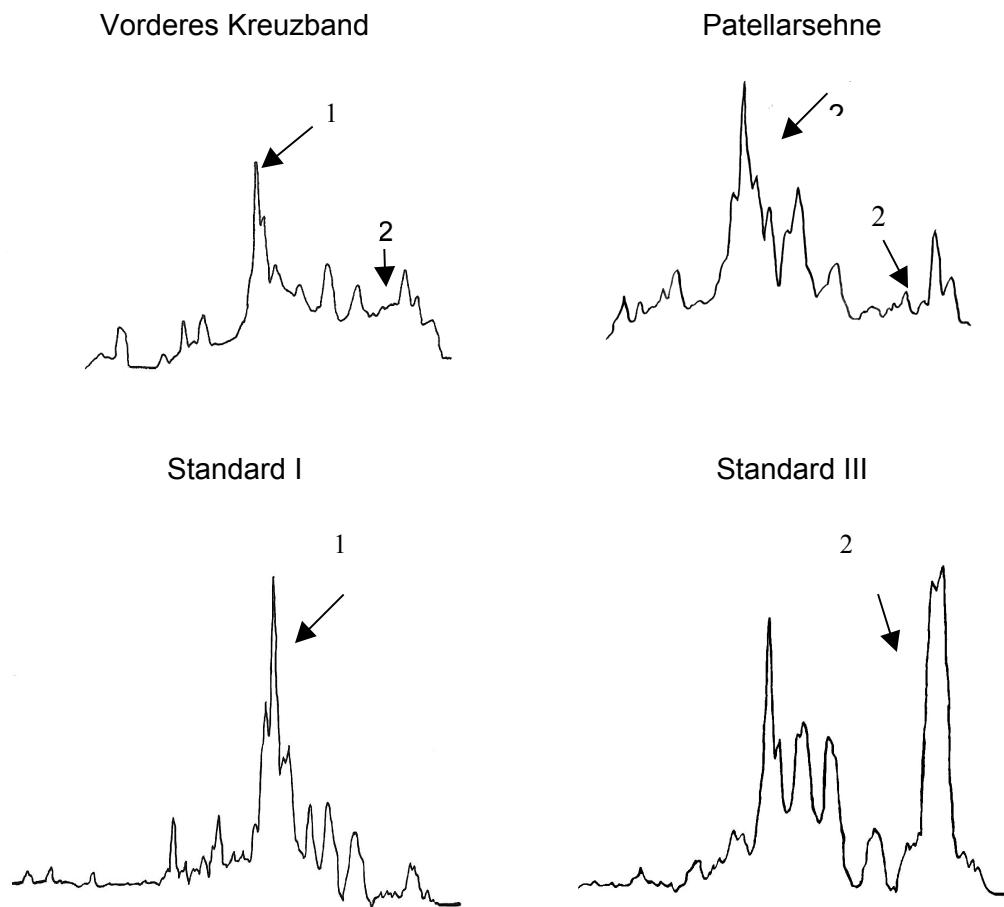
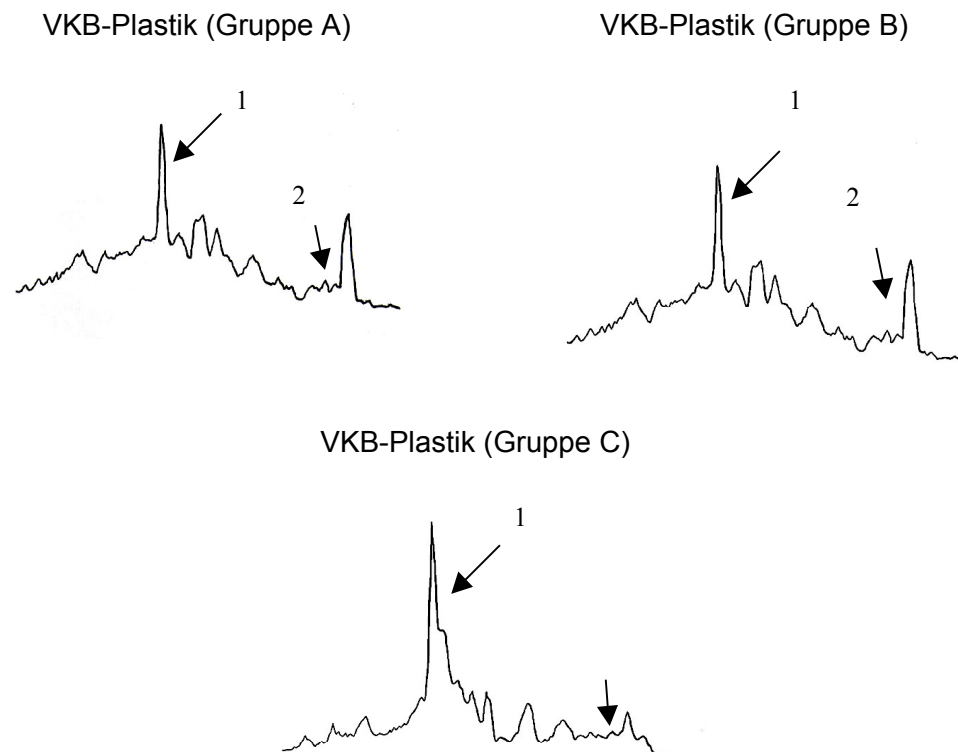


Abb. 61: Abb. 62: Abb. 63: Abb. 64: Darstellung der CNBr-Peptide der Referenzgewebe (PS und VKB) und der Kollagenstandards I und III nach densitometrischer Analyse der gefärbten Gele (1 = α_1 (I) CB 7 + CB 8; 2 = α_1 (III) CB 3).



1 = α_1 (I) CB7+CB8 = Markerpeptid für Kollagentyp I (MG 24 und 25 kDa);

2 = α_1 (III) CB3 = Markerpeptid für Kollagentyp III (MG 7 kDa).

Abb. 65, Abb. 66, Abb. 67: Densitometrische Scans von Kreuzbandtransplantaten der Gruppe A – C nach 56 Wochen Beobachtungszeit.

In den densitometrischen Scans wurde der Kollagentyp I anhand der Peaks α_1 (I) CB7 + CB8 identifiziert und semiquantitativ bestimmt. Der wesentlich kleinere Kollagen-Typ III Anteil wurde mittels des Markerpeptids α_1 (III) CB3 ermittelt. Diese Markerpeptide wurden auf der Basis ihrer bekannten relativen Mobilität R_f identifiziert.

Aus den Vorversuchen war bekannt, dass sich die Kollagen-Typ I und III Konzentrationen der Patellarsehne und des vorderen Kreuzbandes signifikant ($p = 0,001$) unterscheiden. Die Medianwerte lagen für den Kollagen-Typ I und für die Patellarsehne bei 94,8 %, für das vordere Kreuzband bei 90,1 %. Entsprechend kleiner sind die Anteile für den Kollagen-Typ III. In der Patellarsehne beträgt der Anteil 5,2 % und im vorderen Kreuzband mit 9,1 %.

2 Wochen nach der Transplantation verringerten sich die Kollagen-Typ I Konzentrationen der Operationsgruppen. Diese Reduktion der Kollagen-Typ I Konzentration war für alle Gruppen signifikant (A – $p = 0,001$; B – $p = 0,004$; C – $p = 0,001$). Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Invers hierzu verhielt sich die Kollagen-Typ III Konzentration, sie erhöhte sich in allen Gruppen. In den Gruppen B ($p = 0,042$) und C ($p = 0,01$) jeweils signifikant. Innerhalb der Gruppen waren die ermittelten Kollagen-Typ III Konzentrationen ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

Im weiteren Verlauf bis zur 32. postoperativen Woche verringerten sich die Kollagen-Typ I Konzentrationen signifikant ($p = 0,001$), während sich die Kollagen-Typ III Konzentrationen in allen Untersuchungsgruppen signifikant erhöhten.

32 Wochen postoperationem wurde für die Operationsgruppen eine mediane Kollagen-Typ I Konzentration von etwa 85,5 % und eine mediane Kollagen-Typ III Konzentration im Bereich von 14,5 % erreicht. Diese Konzentrationen unterschieden sich zwischen den Gruppen jeweils nicht signifikant.

Bis zur 56. postoperativen Woche veränderten sich die Kollagen-Typ I und III Konzentrationen nur unwesentlich. Lediglich die Konzentrationsverringern von Kollagen-Typ I in der Gruppe A waren signifikant ($p = 0,011$).

56 Wochen nach der Transplantation bestand innerhalb der Gruppen A und C ein signifikanter ($p = 0,015$) Unterschied hinsichtlich der Kollagen-Typ III Konzentration.

In allen Operationsgruppen waren die erreichten Kollagenkonzentrationen im Vergleich zum vorderen Kreuzband für Kollagen-Typ I signifikant ($p = 0,001$) erniedrigt und für Kollagen-Typ III signifikant ($p = 0,001$) erhöht.

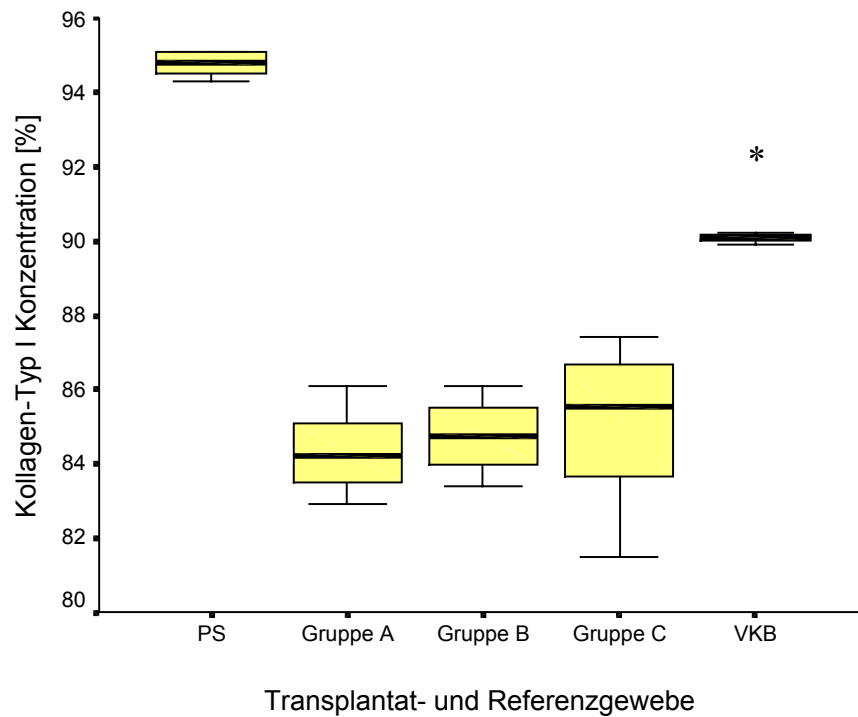


Abb. 68: Vergleichende Übersicht der Kollagen-Typ I Konzentrationen der Operations-gruppen 56 Wochen postoperativ und der Vergleichsgruppen (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband) * $p = 0,001$ gegen Transplantatgruppen A – C;

Hiermit konnte eindeutig unterstrichen werden, dass die Transplantate aller Gruppen erhebliche Veränderungen hinsichtlich ihrer Kollagen-Typ Konzentrationsverteilungen aufwiesen. Im Rahmen des Umbauprozesses kam es zu einer deutlichen Abnahme des für die mechanische Stabilität verantwortlichen Kollagen-Typ I während korrespondierend hierzu eine Zunahme des mechanisch minderwertigen Kollagen-Typs III zu beobachten war.

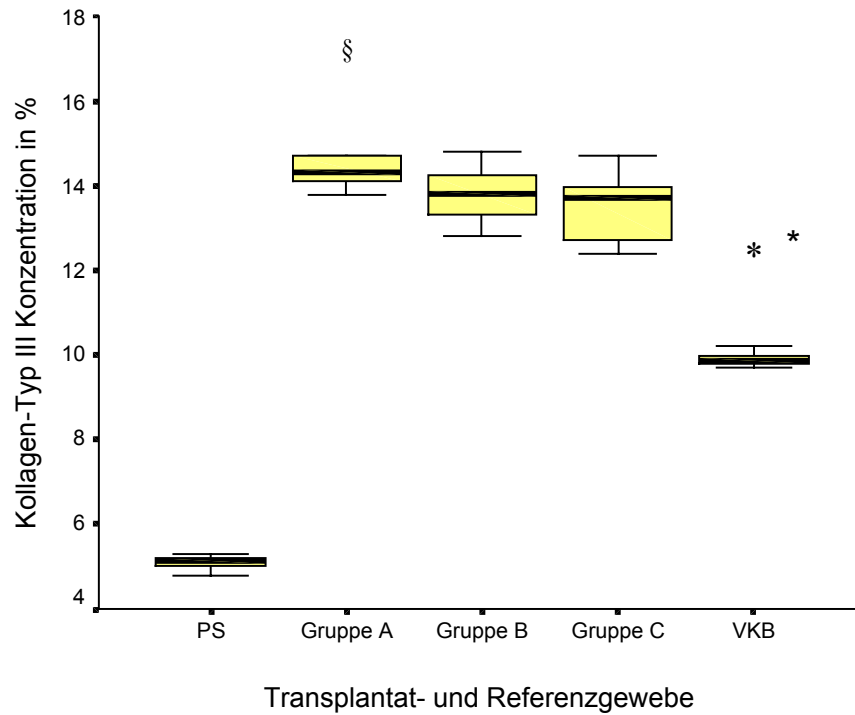


Abb. 69: Vergleichende Übersicht der Kollagen-Typ III Konzentrationen der Operations-gruppen 56 Wochen postoperativ und der Vergleichsgruppen (PS – Patellarsehne, VKB – vorderes Kreuzband); * $p = 0,001$ gegenüber Transplantatgruppen A – C, § $p = 0,015$ gegen Gruppe C

7.9 Ausrissfestigkeitsuntersuchungen

Es wurden fünf unterschiedliche Ausrissmechanismen beobachtet. Die Mehrzahl der Transplantate rissen intraligamentär. Femorale Knochen-blockausrisse 2 Wochen postoperativ waren nur in der Gruppe A zu sehen. In den Vergleichsgruppen wurde dieser Ausrissmechanismus nicht beobachtet.

Die femorale Avulsionsfraktur, die tibiale Avulsionsfraktur und der tibiale Knochenblockausriss wurden in allen Gruppen selten gesehen. Eine Übersicht über die Ausrissmechanismen der einzelnen Gruppen ist in der Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 18: Ausrissmechanismen der Transplantate im Vergleich in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt. Ein Tier in Gruppe B erlitt einen Narkosetod und wurde ausgeschlossen

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Mechanismus / Zeit	2 / 32 / 56 Wo.	2 / 32 / 56 Wo.	2 / 32 / 56 Wo.
femoraler Knochenblockausriss	8 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
femorale Avulsionsfraktur	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
interligamentäre Ruptur	0 / 6 / 5	7 / 5 / 7	6 / 7 / 7
tibiale Avulsionsfraktur	0 / 2 / 2	0 / 3 / 1	2 / 1 / 0
tibialer Knochenblockausriss	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0

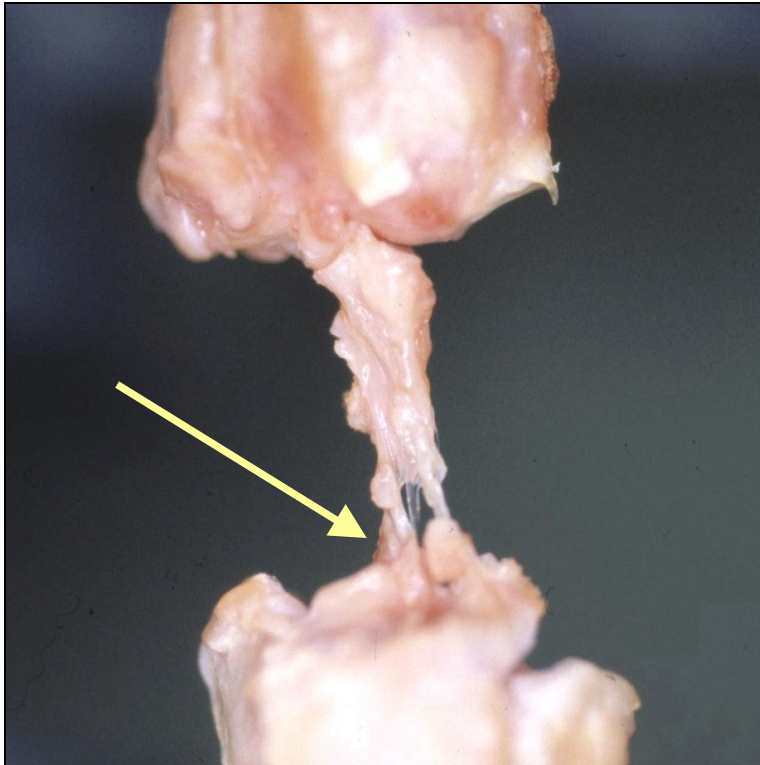


Abb. 70: Detailaufnahme einer Ausrissuntersuchung. Tier der Gruppe B 56 Wochen nach einer vorderen Kreuzbandplastik. Tibialer Ausriss mit kleiner Knochenlamelle.

Die Analyse der biomechanischen Parameter maximale Ausrissfestigkeit und Steifigkeit zeigte im Vergleich zwischen den Untersuchungsgruppen und im zeitlichen Verlauf folgende Ergebnisse:

Tab. 19: Übersicht der Mittelwerte [N] und Standardabweichungen der maximalen Ausrissfestigkeit für die Operationsgruppen und dem vorderen Kreuzband (VKB). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ im Vergleich zu Gruppe A, *** $p < 0,05$ im Vergleich zu Gruppe A und Gruppe B. § $p < 0,001$ gegenüber allen anderen Werten.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	VKB
2 Wo.	71,1 +/- 22,2	99,1 +/- 18,4*	83,1 +/- 18,1**	351,1 +/- 34,4§
32 Wo.	163,8 +/- 21,7	192,6 +/- 36,4*	246,9 +/- 33,1***	351,1 +/- 34,4§
56 Wo.	193,6 +/- 25,1	198,5 +/- 36,4	273,9 +/- 41,7***	351,1 +/- 34,4§

Die Ausrisswerte der Gruppe A (71,2 N) waren gegenüber der Gruppe B (99,1 N) und Gruppe C (83,1 N) 2 Wochen postoperativ signifikant geringer. Die erreichten Werte entsprachen etwa 20-25 % der mittleren Ausrisswerten des vorderen Kreuzbandes.

Die höchsten Steifigkeitswerte erreichten die Gruppe B mit 29,2 N/mm und die Gruppe C mit 29,1 N/mm. Die Gruppe A hatte mit 22,5 N/mm eine signifikant geringere Steifigkeit ($p < 0,05$) gegenüber den Gruppe B und C zu diesem Untersuchungszeitpunkt.

Tab. 20: Übersicht der Mittelwerte [N/mm] und Standardabweichungen der Steifigkeit für die Operationsgruppen und dem vorderen Kreuzband (VKB).
* und ** $p < 0,05$ gegenüber Gruppe A, § $p < 0,01$ gegenüber Gruppen A – C.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	VKB
2 Wo	22,5 +/- 4,8	29,2 +/- 2,8*	29,1 +/- 5,1*	65,7 +/- 4,1§
32 Wo	44,9 +/- 4,2	46,3 +/- 7,1*	51,1 +/- 5,3*	65,7 +/- 4,1§
56 Wo	46,9 +/- 3,7	48,7 +/- 3,7	53,2 +/- 3,2*	65,7 +/- 4,1§

Der Vergleich der einzelnen Operationsgruppen im zeitlichen Verlauf zeigte für alle Gruppen sowohl eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der maximalen Ausrissfestigkeit als auch der Steifigkeit von der 2. zur 32. Woche.

32 Wochen postoperativ waren die Messwerte der Gruppe C mit 246,9 N am höchsten, gefolgt von der Gruppe B mit 192,6 N und der Gruppe A mit 163,8 N.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen A und C und den Gruppen B und C waren jeweils statistisch signifikant.

Die maximalen Ausrissfestigkeiten entsprachen zu 46,4 % (Gruppe A), 54,7 % (Gruppe B) und 70,1 % (Gruppe C) denen des vorderen Kreuzbandes.

In der Gruppe A verdoppelte sich die mittlere Steifigkeit auf 44,9 N/mm. Dieser Wert lag weiterhin unter denen der Vergleichsgruppen B (46,3 N/mm) und C (51,1 N/mm) diese Differenz zeigte jedoch keine Signifikanz.

Im zeitlichen Intervall zwischen der 32. und der 56. Woche erhöhten sich die mittleren Ausrissfestigkeiten und Steifigkeiten nur gering im Vergleich zu den Werten nach 32 Wochen.

56 Wochen postoperativ waren die Ausrissfestigkeiten für die Gruppe C mit 273,9 N deutlich höher als für die Gruppen B (198,5 N) und A (193,6 N). Die Unterschiede zwischen den Gruppen A und C sowie B und C waren jeweils signifikant ($p < 0,05$).

Die mechanische Ausrissfestigkeit der Transplantate in allen Gruppen zum Abschluss der Beobachtungszeit war signifikant ($p < 0,001$) geringer als die des vorderen Kreuzbandes. Die erreichten Werte der einzelnen Gruppen entsprachen in 54,9 % (Gruppe A), 56,4 % (Gruppe B) und 77,7 % (Gruppe C) der mittleren Ausrissfestigkeit des vorderen Kreuzbandes.

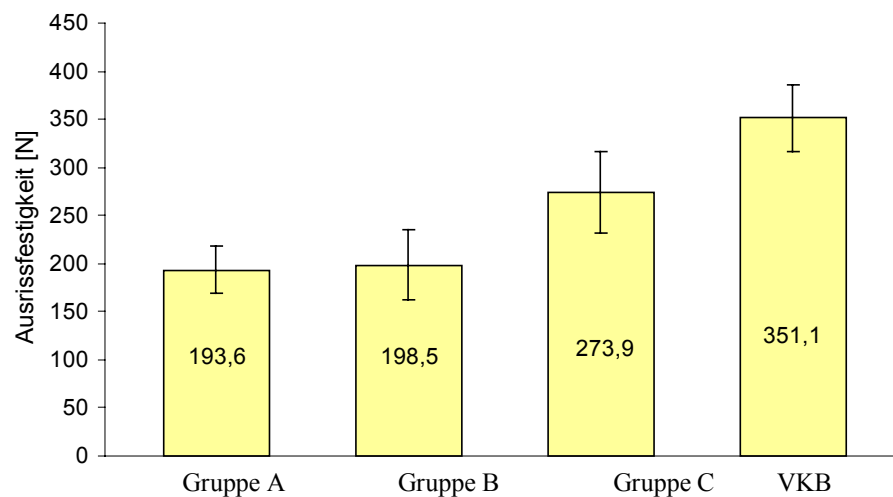


Abb. 71: Mittelwerte und Standardabweichungen der maximalen Ausrissfestigkeit der Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und des vorderen Kreuzbandes (VKB).

Die höchste Steifigkeit erreichten die Transplantate der Gruppe C (53,2 N/mm). Der Unterschied war signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Steifigkeit der Gruppe A (46,9 N/mm), jedoch nicht gegenüber der Gruppe B erhöht. Die prozentual erreichte Steifigkeit der Transplantatgruppen (A - 71,4 %; B - 74,2 % und C - 81,1 %) lag hochsignifikant ($p < 0,001$) unter den Mittelwerten des genuinen vorderen Kreuzbandes (65,6 N/mm).

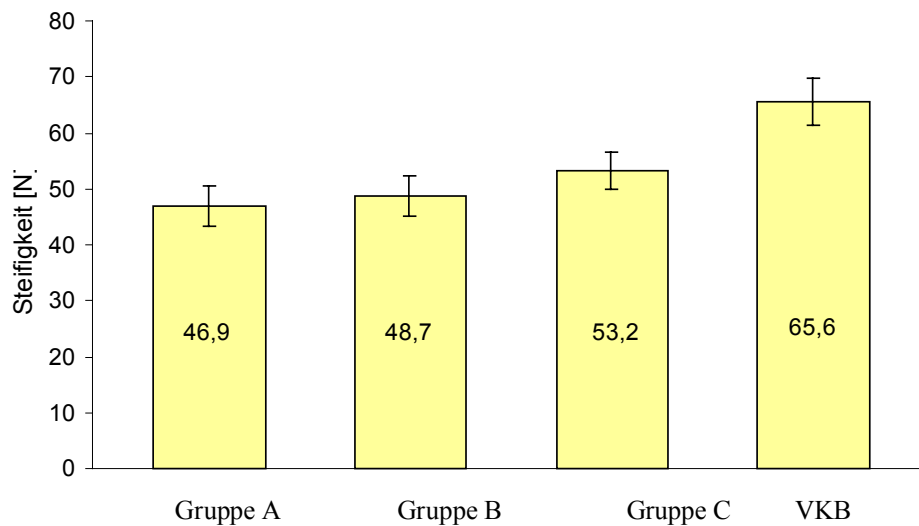


Abb. 72: Mittelwerte und Standardabweichungen der Steifigkeit der Operationsgruppen 56 Wochen postoperativ und des vorderen Kreuzbandes (VKB).

7.10 Korrelationsanalyse

Zur Prüfung der linearen Korrelation der ermittelten Daten wurde eine Rangsummenkorrelation nach Spearman durchgeführt. Geprüft wurde die korrelative Abhängigkeit des Parameters maximale Ausrissfestigkeit zu den Untersuchungszeitpunkten, Faktor XIII-Konzentrationen, medianen Kollagenfibrillendurchmessern sowie die histomorphometrischen, biochemischen und biomechanischen Ergebnisse.

Die Ausrissfestigkeit zeigte eine starke Korrelation zum Zeitpunkt der biomechanischen Untersuchung für alle Gruppen (A - $r = 0,870$; B - $r = 0,745$; C - $r = 0,818$, jeweils $p < 0,0001$).

Zwischen den maximalen Ausrissfestigkeiten und den Faktor XIII-Plasmakonzentrationen 2 Wochen, 32 Wochen und 56 Wochen postoperativ bestand eine schwache korrelative Abhängigkeit ($r = 0,661$, $p < 0,0001$) für die Gruppe A.

Zwischen Zellzahl und maximaler Ausrisskraft der Transplantate bestand in allen Gruppen eine hochsignifikante Abhängigkeit (A - $r = 0,822$; B - $r = 0,836$; C - $r = 0,848$, jeweils $p < 0,0001$). Eine ähnliche Beziehung wurde für die Gefäßanschnittsflächen und die Ausrisskraft der Gruppen B ($r = 0,613$, $p = 0,001$) und C ($r = 0,641$, $p = 0,001$) festgestellt.

Die Analyse der biochemischen Parameter ergab eine signifikante Beziehung zwischen der Pyridinolinkonzentration und der maximalen Ausrisskraft in allen Gruppen (A - $r = 0,675$, $p < 0,0001$); B - $r = 0,607$, $p = 0,002$; C - $r = 0,723$, $p < 0,0001$).

Für die Gruppe B und C bestand eine schwach negative Korrelation (B - $r = -0,541$, $p = 0,015$; C - $r = 0,548$, $p = 0,003$) zwischen Ausrisskraft und prozentualen Kollagen-Typ III Gehalt.

Alle zusätzlich geprüften Parameter zeigten keine signifikanten Korrelationen.

8. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

8.1 Tiermodell, Operationstechnik und Komplikationen

Für die experimentellen Untersuchungen wurde das Kaninchenkniegelenk als Modell gewählt. In zahlreiche wissenschaftlichen Arbeiten konnte dieses Modell in Bezug auf die Anwendbarkeit bestätigt werden (AMIEL et al. 1986, BALLOCK et al. 1989, BLINKENSTAFF et al. 1997, GRANA et al. 1994, GUZZANTI et al. 1994, KENNEDY et al. 1980, PAPACHRISTOU et al. 1998, SCHIAVONE PANNI et al. 1993). Der prinzipielle morphologische Aufbau entspricht dem des humanen Kniegelenkes. Das Gelenk ist jedoch sehr klein und die Präparation sowie das Anlegen der Bohrkanäle, insbesondere femoral, schwierig. In den durchgeführten Untersuchungen wurden Bohrkanäle von 2,7 mm gewählt, diese Größe ist ausreichend um ein Transplantat der gewählten Dimension sicher zu platzieren. In der Literatur wurden teilweise größere Bohrkanäle bis zu 4,5 mm gewählt (FROMM 1994). Dieser Bohrkanaldurchmesser erscheint aufgrund der kleinen Größe des Kniegelenkes zu vulnerabel und strukturalternierend.

Als ein Nachteil des Tiermodells ist der quadropode Stand des Tieres mit einer Kniegelenkflexion von mehr als 120° anzusehen. Dieser gravierende Unterschied ist bei der Beurteilung und Übertragung der ermittelten Daten zu berücksichtigen.

Die Grundidee der Transplantatmodifikation in der Gruppe C geht auf die Tatsache zurück, dass Transplantate nach intraartikulärer Platzierung unter der Exposition einer warmen Ischämie und ohne Gefäßanbindung schnell nekrotisch werden. Die ungünstige Situation sollte durch das Spalten der kollagenen Fasern hinsichtlich der Ernährungssituation verbessert werden. Aus experimentellen Arbeiten ist bekannt, dass lediglich Zellen in der Peripherie eines Transplantates durch die Nähe zur Synovia und der Synovialis vital bleiben können (KLEINER et al. 1986). Aus diesem Grund wurde das Transplantat gespalten, um so die Oberfläche artifiziell zu vergrößern und dem Gesamttransplantat eine bessere Ernährungsmöglichkeit zu geben. GINGSBURG et al. (1980) vertreten sogar die Ansicht, dass die Ernährung einer Patellarsehnen-Kreuzbandplastik durch die Synovialflüssigkeit wichtiger sei als die direkte Blutversorgung.

Die Ernährung eines vorderen Kreuzbandes wird nicht nur durch eine Mikrovaskularisierung getragen, sondern zu einem erheblichen Anteil durch die synoviale Umspülung. RENZONI et al. (1984) berichteten in einem Experiment mit Tritium markierten Prolin, dass die synoviale Ernährung des vorderen Kreuzbandes bis zu 70 % beträgt. Auch in einer aktuelleren Studie von MURAKAMI et al. (1996), welche Tritium-Methyl-Glukose in einem

pharmakokinetischen Kompartimentmodell benutzen, wurde gezeigt, dass mehr als 50 % der Ernährung des vorderen Kreuzbandes durch Permeation von der Synovialflüssigkeit getragen wird.

In einem anderen Versuchsaufbau durch HASHIMOTO et al. (1991) wurde nach selektiver Embolisation der zuführenden Gefäße zum vorderen Kreuzband keine wesentlichen nekrotischen Veränderungen am vorderen Kreuzband von Hunden beobachtet.

Neben der verbesserten synovialen Ernährung der Transplantate sollte durch die Spaltung der Transplantate eine Gewebsverletzung und damit ein reparatorischer Prozess eingeleitet werden, der deutlich früher aktiviert wird als beim herkömmlichen Transplantatumbau. Eine erhöhte Proliferation und Vaskularisierung konnte eindeutig belegt werden. Die Induktion des Reparationsprozesses und eine Verbesserung der Ernährungssituation durch die synoviale Umspülung der Faseranteile durch die Splitting-Technik ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Die gewählte Vorspannung des Transplantates von 17,5 N geht auf eine frühere Untersuchung zurück (LABS et al. 2002). In dieser Studie wurden Transplantate mit 1 N, 7,5 N und 17,5 N vorgespannt und 2, 8 und 32 Wochen postoperativ histomorphometrisch und biomechanisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Qualität und Quantität der histopathologischen Veränderungen durch die eingesetzte Vorspannung determiniert wird. Die Kreuzbandtransplantate der Gruppe mit 17,5 N Vorspannung hatten sowohl morphologisch die größte Ähnlichkeit mit dem normalen vorderen Kreuzband als auch die höchsten Ausrisswerte. Demgegenüber war die mechanische Stabilität in der 1 N Gruppe signifikant geringer.

Auf eine postoperative Immobilisation der operierten Extremität wurde verzichtet. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Immobilisation eines Kniegelenkes negative Veränderungen in den mechanischen Eigenschaften des Bandapparates bewirkt und degenerative Schäden des Gelenkknorpels nach sich zieht (MUNETTA et al. 1993, NEWTON et al. 1995). Auch ultrastrukturelle Veränderungen der Fibroblasten, eine verringerte Permeabilität des vorderen Kreuzbandes (KANDA et al. 1998) und eine erhöhte Expression der Adhäsionsproteine Integrin beta 1, alpha 5 und alpha v (ABIEZZI et al. 1995) wurden beschrieben.

Die gewählten Nachuntersuchungsintervalle sollten eine Beurteilung der kurz-, mittel- und langfristigen Veränderungen ermöglichen. Anlehnend an die von BALLOCK et al. (1989) geforderten langfristigen Standzeiten von mindestens einem Jahr wurden die Tiere auch nach 56 Wochen evaluiert. Für Aussagen zu Sekundärlockerungen der Transplantate und osteoarthrotischen Veränderungen sind insbesondere die Langzeitbeobachtungen sinnvoll. Obwohl die wesentlichen zellulär transformativen Veränderungen bereits im Kleintiermodell

zu einem viel früheren Zeitpunkt abgeschlossen sind, konnte gezeigt werden, dass auch nach der 32. postoperativen Woche strukturelle Veränderungen stattfinden.

Bei keinem operierten Tier trat ein oberflächlicher oder tiefer Infekt auf. Ein Kaninchen der Gruppe B erlitt ein Narkosetod und wurde von der Untersuchung ausgeschlossen. Jeweils ein Tier der Gruppe A und C zeigten radiologisch und klinisch eine laterale Subluxation der Patella. Bei freier Gelenkbeweglichkeit wurden diese Tiere in die Untersuchung mit eingeschlossen. Drei Tiere hatten ein Streckdefizit von 10°, eine Ursache konnte nach der Arthrotomie nicht erkannt werden. Diese Tiere wurden in die Auswertung mit aufgenommen.

Klinisch und radiologisch wurden keine Schraubenlockerungen beobachtet.

8.2 Wirkung der Faktor XIII-Applikation

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nach einer vorderen Kreuzbandplastik die Faktor XIII-Plasmakonzentration postoperativ gegen-über präoperativ signifikant abfiel. Ohne Faktor XIII-Applikation konnten die Ausgangswerte erst nach dem 14. p.o. Tag wieder erreicht werden, während sich nach Substitution von Faktor XIII bereits ab den 3. p.o. Tag der Plasma-spiegel normalisierte und auf ein höheres Niveau bis zum 14. p.o. Tag ein-stellte.

Es ist zu schlussfolgern, dass der eingriffsbedingte Verbrauch des Faktors XIII nur nach längerer Zeit durch die körpereigene Synthese ersetzt werden kann, wodurch die Effizienz von Heilungsvorgängen möglicherweise herab-gesetzt wird.

Ein postoperativer Faktor XIII-Abfall ist durch mehrere klinische Unter-suchungen (BARTHELS et al. 1993, BROCKMEIER und ARNOLD 1999, CHAOUI et al. 1999, DAVIDS und HODEL 1999, ENGELHARDT et al. 1983, MUTO 1977, SILBERZAHN 1993) belegt worden, wobei die Intensität des Abfalls von verschiedenen Variablen, wie Größe des Eingriffes, Konstitution der Patienten und Dauer der chirurgischen Intervention abhängen (KIRSCHNER et al. 1977, MARKTL et al. 1977 und TAUBER et al. 1974).

Die niedrigsten Faktor XIII-Werte werden zwischen dem ersten und sechsten postoperativen Tag beobachtet, also zu einem Zeitpunkt, wo die intensive Migration und Proliferation sowie eine gesteigerte Kollagensynthese für die initiale Gewebsreparatur erforderlich ist. Für den physiologischen Ablauf dieser Reparationsvorgänge ist nach SCHRAMM et al. (1977) eine normale Faktor XIII-Konzentration Voraussetzung.

Um optimale Grundlagen für den multifaktoriellen Vorgang der Binde-gewebsheilung zu schaffen, ist eine komplett vernetzte Fibrin-Matrix zur Einsprossung von Fibroblasten bzw. Osteoblasten erforderlich.

Fibroblasten sind die vorherrschende Zellpopulation und die Hauptsynthese-zellen in Regionen der Bindegewebsheilung. Der Prozess der Bindegewebs-heilung hängt von der Zellzahl und der Syntheseleistung dieser Zellen ab. Die Vernetzung des Fibrins stimuliert die Migration von Fibroblasten in ein Fibringerüst (KNOX et al. 1986). Die Vernetzung der alpha-Ketten wird durch die Faktor XIII-Konzentration bestimmt (BROWN et al. 1993).

Der Faktor XIII bindet Fibronektin an Fibrin- und Kollagenfibrillen, die für einsprossende Fibroblasten als Leitschiene dienen (MIYACHI et al. 1993). Die Interaktionen von Faktor XIII mit Fibrin, Fibronektin und Kollagen liefern bei entsprechenden Faktor XIII-Konzentrationen die grundlegende Matrix für eine stabile und schnelle Bindegewebsreparation.

In vitro-Studien zeigten neben der zellproliferativen Wirkung des Faktor XIII auch positive Effekte auf Zelladhäsion (PAYÉ und LAPÉRE 1986, UEKI et al. 1996), Kollagensynthese (PAYÉ und LAPÉRE 1986) und Mitoserate (BECK et al. 1961, CLAES et al. 1987) von Fibroblasten und Osteoblasten. Aufgrund der stimulierenden Wirkung des Faktor XIII auf die Fibroblastenproliferation empfahl BRUHN (1983) diesen Faktor als *fibroblastenstimulierenden Faktor* und nicht als Faktor XIII zu bezeichnen.

Die vorliegenden Ergebnisse der eigenen Untersuchungen belegen, dass durch die zusätzliche Applikation des Faktors XIII qualitative und quantitative morphologische Veränderungen des Kreuzbandtransplantates resultieren und 2 Wochen postoperativ die Medianwerte der Zellularität und der Gefäß-anschnittsflächen in den Gruppen B und C nach Applikation von Faktor XIII signifikant höher waren als in Gruppe A, was für eine Beschleunigung der initialen Umbauvorgänge spricht.

Neben einem akzelerierten intraartikulären Umbauprozess der Transplantate konnte auch eine verbesserte extraartikuläre ossäre Integration der Knochen-blöcke beobachtet werden. Die Ausrissmechanismen konnten belegen, dass in der Gruppe A ohne Faktor XIII Applikation 2 Wochen postoperativ alle Knochenblöcke herausgerissen wurden. Dies traf für die Gruppen B und C nicht zu. Der positive Einfluss auf die Osteoblastenstimulation und Knochenheilung wurde bereits in früheren experimentellen (CLAES et al. 1999, KIENAPFEL et al. 1995, SCHLENZKA et al. 1993, SCHWAB et

al. 1999) und klinischen Anwendungen (GERNGROß et al. 1987) belegt. Experimentell ließ sich dies durch eine vermehrte Freisetzung der alkalischen Phosphatase und durch eine Zunahme der Mineralisierung untermauern (KUGELMEIER 1985).

Die in der Studie verwendete Dosierung von 50 IE/kg Körpergewicht geht auf Dosisfindungsstudien von CLAES et al. (1999) zurück. Auch in eigenen Voruntersuchungen ließen sich keine wesentlichen pharmakokinetischen Unterschiede bei Anwendung von 50 bzw. 100 IE/kg Körpergewicht finden. So kann die eingesetzte Dosierung über einen Zeitraum von 7 Tagen als adäquat bezeichnet werden.

Als Nachteil der durchgeführten Untersuchung ist zu diskutieren, dass aufgrund der kleinen Kniegelenksdimension des Kaninchens nur eine systemische Applikation von Faktor XIII möglich war. Andererseits ist bekannt, dass in der Synovia des Kniegelenkes kein Thrombin vorhanden ist, welche für die Wirkung des Faktor XIII erforderlich ist. Es ist anzuzweifeln ob die lokale intraartikuläre Applikation die Wirkung auf den Transplantatumbau verbessern würde.

8.3 Makroskopische Befunde und Osteoarthritis

Die makroskopischen Befunde zeigten keine wesentlichen Befund-unterschiede in den Untersuchungsgruppen. Dies gilt auch für die Prüfung der Transplantatspannung und Kniegelenkstabilität. Auffällig war, dass die Transplantate, insbesondere zu den Untersuchungszeitpunkten 2 und 32 Wochen postoperativ, durch eine vergrößerte synoviale Umhüllung, die teilweise mit dem Hoffa'schen Fettkörper kommunizierte, charakterisiert waren. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen (AMIEL et al. 1986, FROMM et al. 1996, KLEINER et al. 1986, PANNI et al. 1997) beschrieben. Diese reaktive Proliferation der Synovialis scheint die Quelle für den vaskulären Anschluss und die Zellmigration in das Transplantat zu sein (KLEINER et al. 1989). Nach Abschluss des Revaskularisationsprozesses bildet sich die proliferierte synoviale Deckschicht zu einer physiologischen ein- bis zweischichtigen typischen Synovialis zurück.

Zur Evaluierung der Knorpelschädigungen wurde der MANKIN-Score genutzt. Die Untersuchungen nach 32 und 56 Wochen deckten eine deutliche Knorpelschädigung auf. Aber auch die nichtoperierten Kontrolltiere zeigten eine erhebliche Progredienz der Knorpelschädigung. Die operative Stabilisierung bei einem derartigen kleinen Gelenk kann eine operationsbedingte Knorpelschädigung induzieren, jedoch sind hierbei auch zusätzlich Überlagerungen mit physiologischen Alterungsprozessen zu berücksichtigen. Nach 56 Wochen zeigten die Gelenke sowohl femoral als auch tibial nachweisbare Knorpelschäden, diese besaßen im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

PAPACHRISTOU et al. (1998) berichteten ebenfalls über Knorpelschäden bei operierten Kaninchenkniegelenken 12 und 22 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff. Auch BALLOCK et al. (1989) sahen frühzeitig, bereits 6 Wochen nach dem Kreuzbandersatz, an Kaninchenkniegelenken initiale Knorpelläsionen. Es ist unklar, ob allein die Arthrotomie und die Anlage von Bohrkanälen als Ursache für diese degenerativen Knorpelveränderungen angesehen werden kann oder, ob die Kreuzbandersatzoperation die physio-logische Kinematik verändert, so dass sekundäre Knorpelläsionen resultieren (HEFTI et al. 1991).

8.4 Morphologische und ultrastrukturelle Ergebnisse

Der histologische Umbau der Transplantate zeigte die typischen phasenhaften Veränderungen, wie sie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurden (AMIEL et al. 1986, BOSCH et al. 1990, PANNI et al. 1997, SOMER 1990).

Vorangegangene Studien betrachteten in der Regel nur isoliert den intra-artikulären Transplantatumbau oder die ossäre Integration der Knochen-blockeinheilung.

Die Insertion von Sehnen und Bändern kann prinzipiell in zwei unterschiedliche Formen unterschieden werden.

Die direkte oder chondrale Insertion zeigt einen typischen Vierzonenaufbau (SCHIAVONE PANNI et al. 1993). Die Zone 1 entspricht der Sehne oder dem Band aus straffem organisiertem Bindegewebe, die Zone 2 ist gekennzeichnet durch fibrocartilaginäres Gewebe. Der Hauptunterschied zwischen Zone 1 und 2 ist der Wechsel der Zellen von dünnen länglichen Fibrozyten zu ovalen bis rundlichen Chondroblasten. Die Zone 2 ist in der Regel recht schmal. Es folgt die Zone 3 des mineralisierten fibrocartilaginären Gewebes. Am Anfang sind nur wenige Mineralisierungen vorhanden, die sich dann säulenartig vermehren. Zwischen der unmineralisierten und der mineralisierten Zone befindet sich eine Transitionszone, die als „tide mark“ bezeichnet wird. Zwischen Zone 2 und 3 konnte immunhistochemisch Kollagen-Typ 2 nachgewiesen werden (PETERSON und LAPRELL 2000). Die Zone 4 besteht aus dem Knochen.

Anders dagegen zeigt sich die indirekte oder fibröse Insertion, welche einen typischen Dreizonenaufbau besitzt. Die Zone 1 besteht aus dem straffen kollagenen Sehnen- oder Bandgewebe. Während die Zone 2 aus Geflechtknochen gebildet wird. Lichtmikroskopisch ist zu erkennen, dass die Kollagenfasern der Sehnen schräg in den Geflechtknochen penetrieren. Die Zone 3 wird aus Lamellenknochen gebildet. Kollagen-Typ II wird in keinem Abschnitt der indirekten bzw. fibrösen Insertion beobachtet (PETERSON und LAPRELL 2000).

In der vorliegenden Studie wurde femoral eine typische direkte Trans-plantatinserktion beobachtet, während tibial sowohl eine direkte als auch indirekte Transplantatinserktion gezeigt werden konnte. Dies hängt mit der Länge des Transplantates und des tibialen Bohrkanals zusammen. Die tibiale Inserktion ist demzufolge initial immer eine Komposition aus direkter und indirekter Inserktion.

In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass die knöcherne Inkorporation nach 32 Wochen abgeschlossen ist (AMIEL et al. 1984, BALLOCK et al. 1989, FROMM 1994, SCHIAVONE PANNI et al. 1993). Unklar und nicht einheitlich ist jedoch die histomorphologische Beschreibung der Transplantatinserktion.

CLANCY et al. (1981) führten eine histologische Analyse an Patellarsehnen-transplantaten am Affenmodell durch und fanden, dass das Transplantat-Knochen-Interface dem des normalen vorderen Kreuzbandes nach 9 Monaten ähnelte. CHIROFF et al. (1975) untersuchten ebenfalls das Patellarsehnen-transplantat am Hundmodell und beschrieben einen typischen zonalen Aufbau der Inserktionen innerhalb von 4 Wochen. SCHIAVONE PANNI et al. (1993) berichteten, dass die anatomische direkte Sehneninserktion des Patellarsehnen-Knochen-Transplantates am Kaninchenmodell einem Degradationsprozess unterliegt und dass sich im Verlauf des Transplantatumbaus wieder eine physiologische direkte Sehneninserktion ausbildet.

All diese Studien geben keine klare Differenzierung zwischen femoraler und tibialer Inserktion an. Für die genaue Beurteilung der Inserktion ist eine parallele Schnittführung zum Transplant bzw. Bohrkanal notwendig und eine regionale Differenzierung der Untersuchungsregion erforderlich.

YOSHIYA et al. (2000) betrachteten erstmalig fünf verschiedene Regionen innerhalb des Knochenkanals während des Transplantateinbaus. Sie unterschieden folgende Zonen:

- Knochen – Knochen – Interface
- Sehneninserktion am Knochenblock des Transplantates
- Sehnen – Knochen – Interface im Bohrkanal
- Zwischenraum zwischen Sehne und Bohrkanal
- Sehngewebe im Knochenkanal

In dieser Studie wurden für das Patellarsehnen-transplantat sowohl eine direkte als auch eine indirekte Inserktion am Hundmodell 12 Wochen postoperativ nachgewiesen. Die Autoren führten aus, dass anders als bei der Semitendinosus-/Gracilissehnen-Inkorporation (BLICKENSTAFF et al. 1997, GRANA et al. 1994, RODEO et al. 1993,

SHOEMAKER et al. 1989, SCRANTON et al. 1993), die Sehneninsertion des Patellarsehnen-transplantates morphologisch der vorderen Kreuzbandanheftung

entspricht. Sie konnten im Weiteren zeigen, dass sich die Ratio aus mineralisierter und unmineralisierter fibrokartilaginären Zone im Zeitverlauf nicht signifikant ändert (YOSHIYA et al. 2000).

Bei der Interpretation der Transplantatinsertionen ist auch die Wahl der Transplantatverankerung zu berücksichtigen. In der vorliegenden Untersuchung konnten morphologische Unterschiede in Abhängigkeit von der Fixationswahl beobachtet werden. Während femoral eine isolierte knöcherne Integration des Knochenblockes stattfand, war tibial eine temporäre Kombination aus direkter und indirekter Insertion nachweisbar.

Die Übersichtlichtmikroskopie ermöglicht zwar eine qualitative Beschreibung der morphologischen Veränderungen, zeigt jedoch Grenzen für quantitative Vergleichsuntersuchungen. Die Anwendung eines histomorphometrischen Verfahrens ist vor allem dort nützlich, wo in Übersichtsvergrößerungen keine markanten Unterschiede zu erkennen sind (WEIBEL und ELLIAS 1967). Hiermit konnten geringfügige Differenzen des intraartikulären Transplantatumbaus demaskiert und quantifiziert werden.

In der so genannten Phase der Degeneration und Nekrose, 2 Wochen nach der Transplantation, zeigten die Operationsgruppen signifikante Unterschiede in den Zellzahlen, der Gefäßanschnittsflächen und der Zellvolumina. Die Transplantate der Gruppe C, die mit der Transplantat-Splitting Technik und einer Faktor XIII-Applikation versorgt wurden, wiesen die höchste Zellularität und die größten Zellvolumina auf. Die histomorphometrischen Veränderungen scheinen hierbei sowohl durch die eingesetzte

mechanische Schädigung des Transplantates als auch durch die frühzeitige Faktor XIII Administration einer vorzeitigen zelluläre Reparationsantwort zu unterliegen. Aber auch die alleinige Faktor XIII Gabe (Gruppe B) hatte im Vergleich zur Gruppe A (Standardversorgung) eine erhöhte Zellularität, Vaskularität und ein größeres Zellvolumen. Die Veränderungen im Zytoskelett der Gruppe B und C präsentierten bereits invadierte Fibroblasten als initiale Reparaturzellen.

Aus den ermittelten Daten kann geschlussfolgert werden, dass ein beschleunigter histomorphometrischer Umbau sowohl durch die alleinige Gabe von Faktor XIII, als auch durch die Kombination der Transplantat-Splitting Technik mit der Faktor XIII Gabe eingeleitet werden kann.

Die prinzipiellen histomorphometrische Veränderungen 2 Wochen postoperativ entsprechen den Ergebnissen von BOSCH et al. (1990) für das Umbauverhalten eines hinteren Kreuzbandtransplantates in der Standardversorgung.

Der Phase der Nekrose folgt die Phase der Revitalisierung. Während 32 Wochen postoperativ die Gruppe C noch die höchste Zellularität und Gefäßdichte besaß, waren die Zellvolumina in dieser Gruppe nicht mehr am höchsten. Die stoffwechselaktiven

Fibroblasten veränderten ihre Zellform zu einer energetisch günstigeren Kugelform. Dagegen wurden in den Gruppen A und B noch weiterhin die syntheseaktiven großen Fibroblasten beobachtet. Dieser Befund spricht für die weiterhin bestehende reparative Aktivität der Zellen in den Gruppen A und B, während diese in der Gruppe C reduziert war.

Im weiteren Verlauf kommt es zur Phase der Rekollagenisierung und Phase des Remodeling. Kennzeichnend für diesen Abschnitt des Transplantatumbaus ist die Abnahme der Zellularität und der Zuwachs an neu gebildeten Kollagen-faserbündeln mit Ausrichtung in axialer Hauptbelastungsrichtung.

56 Wochen nach der Transplantation erreichten die Transplantate einen dem vorderen Kreuzband ähnlichen histomorphologischen Befund, jedoch waren die Zellzahl, die Gefäßanschnittsflächen und das Zellvolumen weiterhin signifikant erhöht. Zwischen den Operationsgruppen bestanden auch nach diesem Zeit-raum weiterhin morphometrische Unterschiede, wobei vom histologischen Aufbau der Gruppen B und C eine größere Übereinstimmung mit dem vorderen Kreuzband auftrat als bei Gruppe A.

Der von AMIEL et al. (1986) inaugurierte und häufig zitierte Prozess der Ligamentisation eines Patellarsehnentransplantates muss auf der Grundlage der histomorphometrischen Ergebnisse abgelehnt werden. Die ermittelten signifikanten morphologischen Unterschiede gestatten nicht, von einem vollständigen

Transplantatumbau zu sprechen. Auch die supportiven Einflüsse, wie der Einsatz von Faktor XIII oder der Transplantat-Splitting-Technik konnten nicht die markanten histogenetischen Unterschiede eines Patellar-sehnentransplantates von einem vorderen Kreuzband aufheben.

Verschiedene Studien zeigten eine Korrelation der mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes zum Kollagenfibrillendurchmesser (CRAIG et al. 1987, FLINT et al. 1984, HART et al. 1999), wobei höhere Stress-expositionen mit einem größeren Kollagenfibrillendurchmesser einhergehen (CRAIG et al. 1987, FLINT et al. 1984). Viele andere Faktoren, wie das Alter (OAKES 1993, PARRY et al. 1978), das Geschlecht (TZAPHLIDOU 2001), der Trainingszustand (OAKES et al. 1982, OAKES 1993) und die Immobilisation eines Gelenkes (BINKLEY und PEAT 1986, CHRISTEL und GIBBONS 1993) sowie der Heilungszustand (CHRISTEL und GIBBONS 1993) des Bandgewebes wurden ebenfalls als bestimmende Kriterien für Fibrillendurchmesser nachgewiesen.

In Anlehnung an eine Klassifikation von AMENTA et al. (1988) können Kollagenfasern in fibrilläre Typen (z.B. Typ I und III) mit einem Durchmesser

> 15 nm und in filamentäre Typen (z.B. Typ VI) mit einem Durchmesser < 15 nm unterschieden werden. Die Darstellung von filamentären Kollagenfibrillen ist schwierig, da ihre Lage keine strenge parallele Anordnung zeigt und in Querschnitten diese dünnen Fibrillen oft nur schräg angeschnitten werden.

Die Bestimmung der Kollagenfibrillendurchmesser und deren Sekundärparameter in der durchgeführten Untersuchung zeigte, dass die Fibrillen eine langsame Abnahme der Durchmesser, gefolgt von einer Zunahme der Durchmesser, durchlaufen. Innerhalb der Transplantatgruppen wurde 32 und 56 Wochen nach der Operation eine signifikante Erhöhung der Durchmesser für die Gruppe C im Vergleich zu den anderen Operationsgruppen festgestellt. Das heißt, das Breitenwachstum der Kollagenfibrillen in dieser Gruppe konnte durch die eingesetzte Manipulation beeinflusst werden. Die verbesserten Ernährungsmöglichkeiten der gesplitteten Transplantate scheinen allein die Ursache für die erhöhten Kollagenfibrillendurchmesser zu sein, da in Gruppe B mit alleiniger Faktor XIII-Applikation eine derartige Veränderung nicht beobachtet werden konnte. Der Prozess des Breitenwachstums ist auch noch nach der 32. postoperativen Woche hinaus zu beobachten gewesen. Die erreichten Werte nach 56 Wochen lagen aber für alle Gruppen signifikant unter denen des vorderen Kreuzbandes.

Die häufig in der Literatur angegebenen Mittelwerte für die Kollagenfibrillenmorphometrie erscheinen als unzureichend, da sie nicht die Streuung der Fibrillendurchmesserverteilungen respektieren. Für diese Aussagen sollte der Medianwert verwendet werden.

Die graphische Darstellung der Kollagenfibrillenverteilungen ist als äußerst hilfreich anzusehen. Es konnten hierbei typische Verteilungen, wie zum Beispiel das unimodale Muster für die Patellarsehne und das bimodale Muster für das vordere Kreuzband beobachtet werden. Aus den Veränderungen der Transplantate war eine typische Linksverschiebung zu kleineren Durchmessern dokumentiert worden.

Für die Veränderungen der Kollagenfibrillenverteilung in Richtung der Zunahme und des Überwiegens von zahlreichen dünnen Kollagenfibrillen im Transplantat werden verschiedene Ursachen diskutiert.

Die Exposition des Transplantates mit der intraartikulären Synovialflüssigkeit ist gekennzeichnet durch die Wirkung von zahlreichen aggressiven Proteinen. Insbesondere in der Frühphase ist die schützende Wirkung der Synovialis nicht gegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass synoviale Kollagenasen in der Lage sind, dicke Kollagenfibrillen in dünne Kollagenfibrillen zu transformieren (CUNNINGHAM et al. 1999).

DECKER et al. (1991) beobachteten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein Kollagenfibrillendesintegration mit der Bildung von zahlreichen dünnen Fibrillen und vermuteten darin einen Grund für die verringerte mechanische Belastbarkeit von Kreuzbandtransplantaten.

Neben der enzymatischen Degradation könnte es sich aber auch um zahlreiche neugebildete dünne Kollagenfibrillen des Kollagen-Typs III handeln. Dicke Kollagenfibrillen repräsentieren den Kollagen-Typ I und werden als Indiz für einen geringen Kollagenumsatz betrachtet (SVOBODA et al. 1983).

Proteoglykane besitzen eine wichtige regulatorische Funktion während des Gewebewachstums und der Reparation. Nach einer Untersuchung von SCOTT et al. (1981) sind die Proteoglykane nahezu zirkulär um die Kollagen-fibrillen gelagert. In dieser Lage verhindern sie ein Breitenwachstum der Fibrillen.

Die Rate der Kollagenfibrillenformation und -organisation wird im Weiteren von den leucinreichen Proteoglykanen Decorin, Lumican (VOGEL et al. 1984), Biglycan (PLAAS et al. 2000) und Fibromodulin (IOZZO 1998), welche an verschiedenen Stellen der extrazellulären Matrix der Kollagenfibrillen wirken, bestimmt. Diese Core-Proteine sind in der Lage, das Kollagenfibrillenwachstum zu hemmen, besitzen aber gleichzeitig einen positiven Einfluss auf den Ordnungsgrad und die Stabilität (NEAME et al. 2000).

NAKAMURA et al. (2000) führte eine Technik ein, wobei selektiv die Expression von Decorin geblockt werden konnte. In einem Reparatursmodell des medialen Seitenbandes wurden elektronenmikroskopisch größere Kollagenfibrillen nachgewiesen als in den Kontrollgruppen. Es bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen dem mittleren Kollagenfibrillendurchmesser und der Expression von Decorin mRNA. Auch erreichten die behandelten Bänder eine höhere Ausrissfestigkeit und eine geringere Dehnung. In dieser Studie gelang es erstmalig durch eine Genmanipulation die Kollagenfibrillenbildung in-vivo zu manipulieren.

Decorin konnte in-vivo in Assoziation mit Kollagen-Typ VI entdeckt werden (TAKAHASHI et al. 1993); dieser Kollagen-Typ wird zusammen mit dem Proteoglykan Chondroitinsulfat in relativ großen Beträgen in den inter-fibrillären Septen gefunden (BRAY et al. 1993). Decorin steht auch in Wechselwirkung mit Fibronectin (SCHMIDT et al. 1987), einem nichtkollagenen Matrixprotein der Bindegewebsheilung. DAHNERS

et al. (2000) zeigten, dass die Decorin-Fibronektin-Verbindung die interfibrillären Kollagenbindungen reguliert.

Experimentell konnte auch gezeigt werden, dass die Akkumulation von großen Mengen Biglycans die Ausbildung eines kräftigen Kollagen-fibrillennetzwerkes limitieren kann und zu persistierenden Entzündungs-prozessen führt, welche wiederum die Wiederherstellung eines funktionellen Bandgewebes behindert (PLAAS et al. 2000).

Ein Anstieg der Proteoglykane Chondroitinsulfat und Dermatansulfat wurde in Kreuzbandtransplantaten nachgewiesen. Während die Erhöhung von Dermatansulfat nur temporär war, persistierte die Chondroitinsulfaterhöhung noch 2 Jahre nach der Kreuzbandoperation (BOSCH et al. 1998).

Ein gesteigerter Hyaluronsäuregehalt soll nach YAMAKAGE et al.(1985) ebenfalls die Fibrillogenese hemmen.

Die ultramorphologische Dickenverteilung der Kollagenfibrillen kann durch zahlreiche weitere Einflussfaktoren wie in-situ Schockfrierung (JACKSON et al. 1991), biologische Reifungsprozesse (HART et al. 1999), Entzündungen (NEURATH und STOFFT 1991), Reparationsprozesse (BOSCH et al.1995, FRANK et al. 1997) und Traumen (DECKER et al. 1991) erheblichen Veränderungen unterliegen.

Auch Alterationen der Quervernetzungen zwischen den Kollagenfibrillen können dafür verantwortlich sein, dass Kollagenfibrillen sich in dünne Fibrillen entwickeln (PARRY und CRAIG 1984).

Eine konstante mechanische Überlastung des Transplantates wurde ebenfalls als Ursache für eine veränderte Kollagenfibrillendistribution diskutiert (BOSCH et al. 1995).

Innerhalb eines anatomischen Substrates konnte eine Heterogenität der Kollagenfibrillenverteilung nachgewiesen werden. BAEK et al. (1998) zeigten, dass für die zu untersuchende Struktur der Entnahmeort ein wichtiger Parameter für die Befundbewertung ist. An humanen Kreuzbändern wurde ein völlig inverses Kollagenfibrillendurchmessermuster gefunden. Das vordere Kreuzband besitzt Fibrillen mit einem Durchmesser von 20 - 170 nm. Der mittlere Querschnitt nahm von proximal nach distal zu (66,1 nm – 74,8 nm – 78,2 nm). Der mittlere Fibrillendurchmesser und die Querschnittsfläche für das vordere Kreuzband sind distal am größten. Der Anteil an Gesamtkollagen pro Querschnitt bleibt jedoch gleich, somit liegt eine Veränderung der Fibrillendistribution vor.

Wenn Sehnen und Bänder strukturell geschädigt werden, unterliegen sie einem biologischen Heilungsprozess und unterschiedlichsten Einfluss-faktoren. Am Ende eines Umbauprozesses entsteht ein hochorganisiertes Bindegewebsregenerat mit verringerten mechanischen Eigenschaften. Es wurde gezeigt, dass geschädigtes

Sehnen- und Bandgewebe nach einem Reparaturprozess nicht mehr die typische Kollagenfibrillenordnung des nativen ungeschädigten Gewebes herstellen kann (MATTHEW und MOORE 1991, POSTACCHINI et al. 1978, WILLIAMS et al. 1985).

Einem ähnlichen Umbau- und Reparatursprozess unterliegt das Patellarsehnentransplantat als vorderer Kreuzbandersatz. Die Patellarsehne ist nicht in der Lage, die Kollagenfibrillenarchitektur und –verteilung des vorderen Kreuzbandes wiederherzustellen. Es treten zwar signifikante Veränderungen auf, doch sind diese nur eine Annäherung an die strukturellen Eigenschaften des vorderen Kreuzbandes. Die Veränderungen sind durch eine signifikante Zunahme von dünnen Kollagenfibrillen gekennzeichnet. Diese Beobachtungen wurden auch in Großtierversuchen von JACKSON et al. (1993) und BOSCH et al. (1995) am Patellarsehnen-transplantat beschrieben.

Der Regulationsprozess der Fibrillenreifung und Fibrillengrößenausbildung ist ein komplexer Vorgang, welcher bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt ist. Die Fibrillengröße hängt von verschiedenen Faktoren, wie der Expression von Kollagen-Typ III (LAPIERE et al. 1977), der Interaktion von Kollagen-Typ I und Typ III (FLEISCHMAJER et al. 1990, LAPIERE et al. 1977) oder Kollagen-Typ V (ADACHI und HAYASHI 1986, NIYIBIZI et al. 2000) und der Interaktion zwischen Kollagen und Proteoglykanen (BOSCH et al. 1995, RUGGERI und BENAZZO 1984) ab.

8.5 Biochemische Ergebnisse

Neben den histomorphologischen Eigenschaften von Transplantaten sind für das Verständnis der Umbauvorgänge und der Beschreibung von Veränderungen biochemische Parameter besonders nützlich.

Untersuchungen zum Zusammenhang von mechanischer Belastbarkeit und biochemischen sowie histologischen Parametern zeigen deutlich, dass der Gesamtkollagengehalt eines Gewebes allein nicht zur Beschreibung der Eigenschaften und des Verhaltens einer Struktur ausreichen. Es sollten vor allem das Verteilungsmuster einzelner Kollagentypen und die Konzentration nichtreduzierbarer, stabiler Quervernetzungen betrachtet werden (WOO et al. 1997).

Hydroxyprolin gilt als ein Indikator für die Präsenz und den Metabolismus von Kollagen, da diese Aminosäure fast ausschließlich im Kollagen von Bindegewebsstrukturen und an der Y-Position des sich wiederholenden Tripeptids Gly-X-Y existiert.

Die Patellarsehne hat mit 73,6 % einen sehr hohen Kollagengehalt. Der Unterschied zum vorderen Kreuzband war jedoch nicht signifikant.

Im Rahmen des Beobachtungszeitraumes zeigten die Transplantate bezüglich ihres Gesamtkollagengehaltes einen unterschiedlichen Verlauf. So wurden in der Gruppe A nur geringfügige Verringerungen beobachtet, die erreichten Werte lagen jedoch zu jedem Untersuchungszeitpunkt unter denen der Patellarsehne und des vorderen Kreuzbandes. Hieraus lässt sich schließen, dass der Kollagenumsatz in dieser Gruppe am geringsten war. Anders dagegen verhielten sich die Kollagenkonzentrationen in den Gruppen B und C. Die Gruppe B zeigte zunächst einen Abbau bis zur 32. Woche, lag nach einem Konzentrationsanstieg nach 56 Wochen über den Werten des vorderen Kreuzbandes. Es kann hieraus geschlussfolgert werden, dass die Prozesse des Kollagenmetabolismus auch nach einem Jahr nicht abgeschlossen sind. Dagegen hatte die Gruppe C einen nur geringfügigen Abfall bis zur 32. Woche, verringerte danach die Gesamtkollagenkonzentration weiter und lag am Ende der Untersuchungszeit nur geringfügig unter den Werten des vorderen Kreuzbandes.

Insgesamt waren die ermittelten Unterschiede für die Kollagenkonzentrationen sehr gering, es bestand weder ein korrelativer Zusammenhang zu den ermittelten Faktor XIII-Konzentrationen noch zu den biomechanischen Belastungsparametern.

Der Gesamtkollagengehalt zeigt eine altersspezifische und gewebsspezifische Abhängigkeit und Veränderung (AMIEL et al. 1984, IPOLITO et al. 1980). Die Kollagenzusammensetzung der Gewebe ist vor allem funktionsdeterminiert.

In der Literatur wird auf die heterogene Verteilung des Kollagen- bzw. Hydroxyprolingehaltes in Sehnen und Bändern hingewiesen (FRANK et al. 1988, FAN et al. 1997, MOMMERSTEEG et al. 1994).

Die Untersuchungen von FRANK et al. (1988) zeigten für das mediale Seitenband die geringsten Werte am Femuransatz und die höchsten Kollagenkonzentrationen im mittleren Teil des Bandes. Ursächlich wurden veränderte Glykosaminoglykankonzentrationen in den Insertionsbereichen als verantwortlich angesehen.

Dagegen fanden FAN et al. (1997) an der Supraspinatussehne, dass der Ansatzbereich einen signifikant höheren Hydroxyprolingehalt besitzt als im eigentlichen Sehnenverlauf.

LEMLEY und WELCH (1991) zeigten in ihrer Arbeit am Beispiel der humanen Patellarsehne, dass die Hydroxyprolinkonzentration der einzelnen Proben von 1,88 – 3,34 µg/mg TG (n = 5) stark variierte.

Es kann in diesem Zusammenhang postuliert werden, dass der Gesamtkollagengehalt bzw. die Hydroxyprolinkonzentration, wie bereits oben erwähnt (WOO et al. 1997), ein für die Gesamteigenschaften der Transplantate unspezifisch messbarer Parameter ist und großen regionalen Schwankungen unterliegt.

Der Nachweis der Kollagentypen kann qualitativ mit immunhistochemischen Methoden (NEURATH und STOFFT 1992a, PETERSEN und TILLMANN 1999) oder quantitativ-biochemisch mit chromatographischen, RIST- (Radioimmunsorbent), ELISA- oder elektrophoretischen Verfahren (AMIEL et al. 1986, CAMPA et al. 1990, HANSON und BENTLEY 1983, RIECHERT 2001, WIGGINS et al. 1994) oder mittels RNA-Analyse (HSIEH et al. 2000, YU et al. 1999, LIU et al. 1996, LIU et al. 1997) erfolgen.

In Sehnen und Bändern dominieren die Kollagene Typ I und Typ III, aber auch andere Kollagentypen wurden nachgewiesen (ADACHI und HAYASHI 1986, NIYIBIZI et al. 2000, PETERSEN und TILLMANN 1999).

Kollagen-Typ I ist für die mechanische Festigkeit von Bindegewebe verantwortlich. Der Anteil in Sehnen und Bändern liegt bei über 90 %.

Kollagen-Typ II wird regelmäßig in den zentralen Anteilen des vorderen Kreuzbandes gefunden. Es handelt sich hierbei um fibrokartilaginäre Gewebsformationen mit typischen Chondrozyten und dem Nachweis von Kollagen-Typ II in der perizellulären Matrix der Chondrozyten. Die Ursache für das Vorhandensein dieser Zellformation wird in auftretende Druck- und Zugbelastungen des vorderen und hinteren Kreuzbandes gesehen (PETERSEN und LAPRELL 2000).

Im Weiteren findet man Kollagen-Typ II in der Ansatzregion der Kreuzbänder innerhalb des unverkalkten Faserknorpels und des verkalkten Faserknorpels (PETERSEN und LAPRELL 2000).

Kollagen-Typ III ist in deutlich geringerer Konzentration als Kollagen-Typ I vorhanden und hat eine elastische Funktion. Charakteristisch für diesen Kollagentyp ist die Existenz von intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Cystinresten nahe dem C-terminalen Bereich der Triplehelix, die der Stabilisierung des Kollagenmoleküls dienen (AMIEL et al. 1993, CHUNG et al. 1974, VAN DER REST und GARRONE 1991). Kollagen-Typ III bildet dünne oder mit Kollagen-Typ I gemeinsame heterotype Fibrillen aus, so dass einige Kollagenfibrillen als molekulare Legierungen angesehen werden müssen (AMIEL et al. 1993, LAPIERE et al 1977, VAN DER REST und GARRONE 1991).

Durch Brückenbildungen mit der Basalmembran von Gefäßen hat es eine Funktion bei der Anheftung der Gefäße in der extrazellulären Matrix. Insbesondere im Granulations- und Reparationsgewebe wird dieser Typ vermehrt gefunden. Der Kollagen-Typ III ist ubiquitär im Bandverlauf vorhanden, die höchsten

Konzentrationen befinden sich in der Nähe der Insertionszonen der Kreuzbänder (NEURATH und STOFFT 1992b).

Kollagen-Typ IV wird in allen Basalmembranen von Gefäßen gefunden. Die Färbung mit monoklonalen Antikörpern kann als Nachweis für die Gefäßdichte genutzt werden.

Kollagen-Typ V ist bisher wenig untersucht, hat aber möglicherweise eine regulatorische Funktion auf die Kollagenfibrillendurchmesser. Kollagen-Typ V besitzt zusätzliche amino-terminale Peptide, die eine Schlüsselstellung in der Regulation der Fibrillenausbildung besitzen sollen. Ein Modell, in dem Kollagen-Typ V den Kollagen Typ I kontrolliert und reguliert, wurde beschrieben (LINSENMEYER et al. 1993).

Studien am Knochen zeigten, dass kovalente cross links zwischen Kollagen-Typ I und V bestehen (NIYIBIZI und EYRE 1993).

Kollagen-Typ VI wird in filamentären Strukturen gefunden, welche zwischen den großen Kollagenfibrillen liegen. Es wird auch als interfibrilläres Gleitfilament bezeichnet. Es ist in der Regel parallel zu Kollagen-Typ III ausgerichtet und unterteilt Kollagenstrukturen in Untergruppen. Die Konzentration des Kollagen-Typ VI ist im distalen Drittel des vorderen Kreuzbandes am höchsten (NEURATH und STOFFT 1992a). Möglicherweise stellen die Filamente des Kollagen-Typs VI eine wichtige Verbindung zu den Proteoglykanen dar (BRAY et al. 1990).

In der eigenen Studie wurde für die Kollagen-Typen I und III Analyse ein elektrophoretisches Verfahren weiterentwickelt, welches sich in Anlehnung an die beschriebenen Methoden von LAURENT et al. (1981) und RIESLE et al. (1998) orientierte.

Jeder Kollagentyp spaltet sich in Abhängigkeit von der Position der Azetyl-Methioningruppen unter Einwirkung von Bromcyan mit 70%iger Ameisensäure als Lösungsmittel in Peptide unterschiedlicher Molekulargewichte auf. Diese Eigenschaft wurde zur Identifizierung der Kollagentypen benutzt. Im Elektropherogramm wurde die Position der CNBr-Peptide in den zu untersuchenden Gewebeproben anhand der Position dieser Peptide gegenüber reinen Kollagenstandards, die nach der gleichen Vorschrift wie das Analysematerial aufgearbeitet wurden, bestimmt. Dabei ist die Färbeintensität der Banden im gefärbten Gel proportional der Konzentration dieser Peptide in den Proben (CHAN und COLE 1984, COLE und BEAN 1979).

Für den Kollagen-Typ I wurden die Markerpeptide $\alpha_1(I)$ CB7 und $\alpha_1(I)$ CB8 mit den Molekulargewichten von 24 kDa und 25 kDa verwendet. $\alpha_1(III)$ CB3 mit einem Molekulargewicht von 7 kDa wurde als Markerpeptid für den Kollagen-Typ III benutzt (AMIEL et al. 1984, 1986, COLE und BEAN 1979, FAN et al. 1997, SCOTT und VEIS 1976, SCOTT et al. 1976).

Um eine möglichst vollständige Bromzyanspaltung der Kollagenmoleküle zu erreichen, wurde in Anlehnung an FAN et al. (1997) eine zweimalige Spaltung über je 20 Stunden

bei Zimmertemperatur durchgeführt. In der elektrophoretischen Auftrennung ließen sich danach keine hochmolekularen Peptide nachweisen.

Im Gegensatz zu Pepsin, das auch zur Spaltung der Kollagenmoleküle verwendet werden kann, jedoch nur weniger als 25 % spaltet, wird bei Verwendung von Bromzyan 70 – 90 % (HARWOOD und AMIEL 1992) bzw. über 95 % (SYKES et al. 1976) des Kollagens verdaut und gespalten. Pepsin wirkt nur in terminalen, nichthelikalen Segmenten der Kollagenmoleküle, dagegen sind tripelhelikale Bereiche wahrscheinlich aufgrund der Quervernetzungen dem Angriff von Pepsin gegenüber resistent

(EPSTEIN 1974). Bromzyan gespaltenes Kollagenmaterial ergibt damit einen reelleren Eindruck von der Quantität der einzelnen Kollagentypen in dem zu untersuchenden Gewebe und ist effektiver. Die Bromzyanspaltung sollte deshalb auch insbesondere dann angewendet werden, wenn der Nachweis eines Kollagentyps mit nur einem geringen Anteil am Gesamtkollagengehalt erfolgen soll.

Eine vor der Bromzyanspaltung durchgeführte Denaturierung des Kollagen-moleküls führt zu einer weiteren Vervollständigung der Spaltung der Methioningruppen (RIESLE et al.1998).

Mit der Silberfärbemethode, die 100-fach sensitiver als die Färbung mit Coomassie Blau ist, ließen sich niedermolekulare Peptide <14 kDa gut nachweisen und densitometrisch quantifizieren (BJELLQVIST et al. 1993). Die Vorteile der Silberfärbung bestehen in dem besseren Nachweis niedermolekularer Peptide und in der Möglichkeit, auch Peptide geringerer Konzentrationen zu identifizieren. Die Reduktion des Probenmaterials mit DTT vor der Elektrophorese erhöht die Sensitivität der Silberfärbung (HODNY und SYROVY 1993). Der Nachteil der Coomassie Blau-Färbung liegt hauptsächlich darin, dass pro Auftrennungsspur eine Mindestkonzentration von 20 - 40 µg aufgetragen werden muss und dass bei aufgetragenen Mengen von ca. 10 µg Protein weniger zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden (O'DRISCOLL et al. 1995). Deshalb wurde in früheren Veröffentlichungen auch häufig beschrieben, dass in Sehnen keine Kollagen-Typ III Konzentration messbar war. Die Ergebnisse der vorliegenden

Studie zeigen jedoch, dass auch in der Patellarsehne mit einer relativen Menge von ca. 5 % der Kollagen-Typ III nachweisbar war.

Die Resultate ergaben gut reproduzierbare, zuverlässige Ergebnisse auch im Bereich der Peptide mit einem geringen Molekulargewicht. Die Hauptgründe dieser Beobachtung liegen neben der vor der zweifachen Bromzyanspaltung durchgeführten Denaturierung in der Verwendung der Silbernitratfärbung, einer ausreichend langen Fixierung der aufgetrennten Peptidfragmente in 40%igem Ethanol und 10%iger

Essigsäure sowie im Anschluss daran einer Fixierung über mindestens 12 Stunden in je 5%iger Ethanol-Essig-säurelösung.

Der Vorteil der dargestellten und modifizierten Methode besteht in einer schnellen, technisch einfachen Durchführbarkeit gegenüber den Methoden, die eine chromatographische Auftrennung vor der SDS-PAGE enthalten.

Die dargestellten Ergebnisse sind reproduzierbar, was die Effizienz und Zuverlässigkeit dieser Methode zeigt.

Der Verzicht auf eine Vorreinigung mittels Chromatographie senkt die Gefahr des Materialverlustes sowie den Zeit- und Kostenaufwand bei gleichen Analyseergebnissen.

Für Sehnen und Bänder wurden in der Vergangenheit typische Verteilungsmuster der Kollagen-Typen I und III beschrieben (AMIEL et al. 1986, RIECHERT).

Hierbei zeigte sich, dass das vordere Kreuzband einen fast doppelt so hohen Anteil an Kollagen-Typ III im Vergleich zur Patellarsehne enthält.

Innerhalb der durchgeführten Untersuchung zeigten die Transplantate im Zeitverlauf eine signifikante Erhöhung der Kollagen-Typ III- und eine entsprechend signifikante Reduktion der Kollagen-Typ I Konzentrationen. Am Ende der Beobachtungszeit erreichten die Transplante eine Kollagen-Typ III Konzentration, die etwa 3-fach so hoch war wie die der Patellarsehne und etwa 1,5-fach so hoch wie die des vorderen Kreuzbandes.

Die Kollagen-Typ III Konzentrationserhöhung zeigte eine signifikant negative Korrelation mit der maximalen Ausrissfestigkeit für die Gruppen B ($p = 0,015$) und C ($p = 0,003$). In Langzeituntersuchungen an Rindern konnten NG et al. (1996) eine nichtsignifikante negative Korrelation zwischen der Kollagen-Typ III Konzentration und der Ausrissfestigkeit zeigen. Die erheblichen Veränderungen der Kollagen-Typen Verteilung in den Untersuchungsgruppen ist als eine wesentliche Ursache

für die biomechanischen Defizite der Transplantate gegenüber dem nativen vorderen Kreuzband anzusehen.

Der Kollagen-Typ III ist in embryonalem Gewebe und Granulationsgewebe vermehrt nachweisbar und wird deshalb als eher unreife Kollagensubstanz beschrieben. Der höhere Anteil an Kollagen-Typ-III sagt jedoch nicht aus, dass es sich um unreifere Gewebe handelt, sondern dass die Kreuzbandtransplantate metabolisch aktivere Strukturen darstellen. Die Anwesenheit von Kollagen-Typ III spricht auch für eine Neubildung von Kollagen, es existiert eine stete Kollagensynthese. Untersuchungen zeigten, dass Kollagen-Typ III in verletzten Bindegewebsstrukturen vermehrt vorhanden ist (WILLIAMS et al. 1984) und somit eine wesentliche Rolle in

Heilungsprozessen spielt. Kollagen-Typ III kann sich im Zeitverlauf in die reifere Form, des Kollagen-Typ I umwandeln (NG et al. 1996). NG et al. (1996) beschrieben als Hinweis auf Umbauvorgänge nach vorderer Kreuzbandplastik mittels eines Patellarsehnentransplantates am Rinder-modell eine höhere Typ III-Konzentration im Transplantat nach 24 Wochen postoperativ als nach 3 Jahren.

FAN et al. (1997) zeigte in seiner Untersuchung am Beispiel der Supraspinatussehne, dass die Ratio von Kollagen-Typ I und III in Geweben nicht konstant ist, sondern sowohl während der Entwicklung als auch bei pathologischen Prozessen sich verändert.

Eine hohe Konzentration von Kollagen-Typ III ist ein Hinweis für ein Überwiegen von dünnen Kollagenfibrillen (NIYIBIZI et al. 2000). In Kreuzbandtransplantaten konnte gezeigt werden, dass Fibrillen mit einem Durchmesser zwischen 40-50 nm immer mit Kollagen-Typ III vergesellschaftet waren (DECKER et al. 1990). Kollagen-Typ III scheint die Fibrillendurchmessergröße mit zu regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass Kollagen-Typ III sowohl mit dicken als auch mit dünnen Fibrillen assoziiert sein kann (KEEN et al. 1987).

Immunhistochemisch wurde Kollagen-Typ III im lockeren Bindegewebe gefunden, welches Kollagen-Typ I positive Fibrillen umgibt und in dünne Kollagenfibrillen separiert (PETERSEN und TILLMANN 1999).

Unterschiede bezüglich der mechanischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Bindegewebe liegen in der Art und Zahl der gebildeten Quervernetzungen. Sie sind ein verlässlicher Parameter für die Beschreibung von Materialeigenschaften, wie z. B. die Zugfestigkeit (FRANK et al. 1995) der chemischen und enzymatischen Resistenz (FRASER 1998, FUJII et al. 1994). Sie reflektieren den Kollagenmetabolismus und den Reifegrad des Kollagens eines Gewebes (FRASER 1998, HARWOOD und AMIEL 1992). Reife, nichtreduzierbare

Quervernetzungen sind essentiell für die Struktur und Funktion der Sehnen und Bänder (FRASER 1998, TANZER 1973).

Die komplexen Mechanismen der Bildung und Regulierung der einzelnen Schritte der Kollagenbiosynthese, insbesondere der Bildung der nichtreduzierbaren Quervernetzungen, sind bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur zum Teil aufgeklärt. Prinzipiell lassen sich unreife reduzierbare und reife nichtreduzierbare Quervernetzungen unterscheiden.

FUJIMOTO et al. (1978) zeigte in einer seiner Untersuchung, dass die Stabilität der Kollagenfasern mit zunehmendem Alter steigt und mit einer Abnahme der

Konzentration der reduzierbaren und Zunahme der nicht-reduzierbaren Quervernetzungen korreliert.

Auch TAKAHASHI et al. (1995) fand in seiner Studie, dass sich die Quervernetzungskonzentrationen in den Sehnen und Bändern des Menschen mit dem Alter verändern.

Entsprechend ihrer Funktion und Lokalisation im Organismus enthalten die einzelnen Gewebe unterschiedliche Konzentrationen und Verteilungsmuster an nichtreduzierbaren Quervernetzungen. Deoxypyridinolin z. B. ist haupt-sächlich im Knochen existent, während es in anderen Geweben nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar ist.

Zur Bestimmung der Konzentration nichtreduzierbarer Quervernetzungen Pyridinolin (PYR) und Deoxypyridinolin (DPD) wurden zwei kommerzielle ELISA-Kits verwendet. Diese ELISA-Verfahren stellen ein gegenüber der Chromatographie methodisch vereinfachtes Verfahren auf der Grundlage einer Reaktion des Pyridinolinringes mit gegen ihn gerichtete spezifische Antikörper dar (SEIBEL et al. 1994).

Die Untersuchungen von WOO et al. (1997) und FRASER (1998) bezüglich des Zusammenhanges zwischen biochemischen und biomechanischen Eigenschaften zeigten, dass die Dichte bzw. Konzentration reifer Quervernetzungen der beste Prädiktor für Materialeigenschaften ist, d.h. es existiert eine direkte Beziehung zwischen der Konzentration der reifen Quervernetzungen, die in engem Zusammenhang mit dem Kollagengehalt steht und der mechanischen Festigkeit, Resistenz und Widerstandsfähigkeit eines Gewebes.

Für die Patellarsehne existierten sehr geringe Pyridinolin- und Deoxypyridinolinkonzentrationen. Die Unterschiede gegenüber dem vorderen Kreuzband waren hochsignifikant.

In den Operationsgruppen kam es im zeitlichen Verlauf zu Konzentrationsverschiebungen, wobei die erreichten Werte aller Operationsgruppen am Ende der Beobachtungszeit für Pyridinolin etwa sechsmal höher waren als in der Patellarsehne und nur geringfügig unter den Werten des vorderen Kreuzbandes. Ein signifikanter Unterschied bestand lediglich in der Gruppe A, welche auch die geringsten biomechanischen Ausrissfestigkeiten besaß. Es bestand ein signifikanter korrelativer Zusammenhang zwischen der Pyridinolinkonzentration und der mechanischen Ausrissfestigkeit der Transplantatgruppen.

Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch die Arbeitsgruppen CHAN et al. (1998), FRANK et al. (1995) und NG et al. (1996). In allen Studien konnte ebenfalls ein signifikanter korrelativer Zusammenhang zwischen der mechanischen Ausrissfestigkeit

von Bindegewebsregeneraten und der Pyridinolinkonzentration festgestellt werden. NG et al. (1996) sehen die Pyridinolinkonzentration als den besseren biochemischen Marker als die Gesamtkollagenkonzentration an. Den Reifungsprozess von Kollagenfibrillen unter der Synthese von Pyridinolin halten sie für wichtiger als die isolierte Betrachtung der Gesamtkollagenproduktion.

Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen der Quervernetzungen, die alle mittels einer chromatographischen Methode ermittelt wurden, zeigen selbst innerhalb eines Modells deutlich die starke Varianz der Werte. Die Ursache dafür ist bisher weder bekannt noch diskutiert worden. Der Vergleich der Pyridinolinkonzentration in der Untersuchung von HARWOOD und AMIEL (1992) mit denen der eigenen Studie zeigte für die Patellarsehne annähernd identische Werte, jedoch für das vordere Kreuzband etwa doppelt so hohe Konzentrationen.

Die Deoxypyridinolinkonzentrationen der Transplantate waren 56 Wochen postoperativ ca. 3-5-fach höher als die der Patellarsehne und lagen alle geringfügig über den Konzentrationen des vorderen Kreuzbandes.

Ein direkter Vergleich der Deoxypyridinolinkonzentrationen mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten und denen der Literatur ist nicht möglich, da entweder diese nicht analysiert wurden oder die Angabe „non detected“ erfolgte. Die Ergebnisse der eigenen Studie bezüglich der Deoxy-pyridinolinkonzentration in Gewebeproben zeigte im Gegensatz zu den Resultaten von EYRE (1984), dass auch in der Patellarsehne Deoxypyridinolin in messbaren Konzentrationen nachweisbar ist.

Als eine für die Vergleichbarkeit von Daten recht nützliche Berechnungsgrundlage sieht FRASER (1998) die relative Verteilung der Quervernetzungen an. Sie wird ermittelt aus der Ratio der Pyridinolinkonzentration bezogen auf eine Einheit Deoxypyridinolin.

Für die Patellarsehne war diese Ratio mit 15:1 am geringsten. Die Transplantate zeigten 56 Wochen nach der Operation eine höhere Ratio als die Patellarsehne, lagen aber deutlich unter dem vorderen Kreuzband. Unter den Transplantaten hatte die Gruppe C sowohl hinsichtlich der Einzelkonzentrationen der nichtreduzierbaren Querbrücken als auch der Ratio die größte Annäherung an das vordere Kreuzband.

Somit gilt als bewiesen, dass in-vivo Manipulationen wie die Faktor XIII-Applikation oder die Kollagen-Splitting-Technik einen Einfluss auf die Synthese der nichtreduzierbaren Quervernetzungen hat. In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen ist die Pyridinolinkonzentration ein valider Marker zur Einschätzung der biomechanischen Leistungsfähigkeit eines Bindegeweberegenerates.

8.6 Biomechanische Ergebnisse

In der Literatur gibt es keine übereinstimmenden Empfehlungen hinsichtlich der optimalen Ausrissgeschwindigkeit. Es existieren starke Variationen im Versuchsaufbau, der Winkelstellung des Kniegelenkes und der Ausrissgeschwindigkeit. Aus diesem Grund sind die Daten in der Literatur nur mit Einschränkung vergleichbar.

In der eigenen Untersuchung wurden entsprechende Empfehlungen von WOO et al. (1987) eingehalten. Als besonders wichtig erschien hierbei, dass die Zugkräfte parallel zum Transplantat gerichtet sind und jede Form der Rotation vermieden wird.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gruppen signifikante Unterschiede in ihren biomechanischen Parametern und in den Ausrissmechanismen hatten.

2 Wochen postoperativ hatten die Transplantate erwartungsgemäß die geringsten maximalen Ausrisskräfte und Steifigkeiten. Nach biomechanischen Gesichtspunkten unterscheiden KASPERCZYK et al. (1991) diese Phase des morphologischen Umbauprozesses in 2 Abschnitte: A. Initium und B. Manifestation. Initial, das heißt unmittelbar postoperativ wird die Festigkeit des Systems durch die Fixation des Transplantates bestimmt. Mit der Manifestation wird die Ausprägung der Nekrosenvorgänge erreicht, und das Transplantat gelangt in ein Belastungsminimum. Zwischen den Untersuchungsgruppen gab es zu diesem Zeitpunkt bereits für die Gruppe A und Gruppe B einen signifikanten Unterschied. Während die Gruppe A mit der Standardversorgung ohne Faktor XIII Gabe die geringsten Ausrisswerte und Steifigkeiten erreichte, waren die Werte für die Gruppe B und C deutlich höher. Es lässt sich hieraus schlussfolgern, dass die Applikation des Faktor XIII in der Frühphase die bio-mechanische Belastbarkeit des Knochen-Transplantat-Knochen-Komplexes eindeutig erhöht. Der Übergang zwischen Initium und Manifestation ist fließend, die Schwächung des Knochen-Transplantat-Knochen-Komplexes wird von beiden Anteilen getragen.

Die veränderte Transplantataufbereitung bei der Transplantat-Splitting-Technik (Gruppe C) zeigte keine wesentliche Schwächung des Transplantates 2 Wochen postoperativ. Zwischen den Gruppen B und C bestand kein signifikanter Unterschied, die Werte für die maximale Ausrissfestigkeit lagen jedoch für beide Gruppen höher als für Gruppe A.

Die Gruppe A war die einzige Versuchsgruppe, in der 2 Wochen postoperativ alle Transplantate an der femoralen knöchernen Verankerung versagten. Die gewählte Operationstechnik in femoraler press-fit Verankerung stellt nicht den Schwachpunkt dar, denn intraoperativ konnte in jedem Fall bei maximalem manuellen Zug eine sichere Verankerung belegt werden. Gegen eine biomechanische Limitierung der press-fit-Technik spricht auch, dass in den Vergleichsgruppen keine Knochenblockdislokation bzw. ein Knochenblock-ausriss beobachtet wurde. Es ist vielmehr ein weiterer Beweis, dass die

Gruppen B und C unter Faktor XIII Gabe eine schnellere und sicherere ossäre Integration aufwiesen. Entsprechend konnte biomechanisch belegt werden, dass die Faktor XIII Gruppen initial eine erhöhte Ausrissfestigkeit der Transplantate ($p < 0,05$) hatten.

Die Ausrissmechanismen können durch die gewählte Prüfgeschwindigkeit beeinflusst werden. Während NOYES et al. (1974) für langsame Ausrissraten vor allem tibiale Avulsionen beobachtete, sahen AZANGWE et al. (2000) häufiger tibiale Avulsionsfrakturen bei Prüfgeschwindigkeiten von 500 mm/min. Dagegen berichteten sie auch über das gehäufte Auftreten von tibialen Avulsionsfrakturen bei extrem langsamen Ausrissgeschwindigkeiten von 0,5 mm/min. Sicher ist, dass die Geschwindigkeit auch die Strukturzerstörung kollagener Fasern beeinflusst. In vergleichenden

rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei langsamen Geschwindigkeiten sukzessiv Faseranteile über eine längere Distanz zerstört werden. Dagegen führen hohe Testgeschwindigkeiten zu einem gleichmäßigen Riss der Fasern auf einer Ebene mit geringerer oberfächlicher Desorganisation der Kollagenfibrillen (AZANGWE et al. 2000).

32 Wochen postoperativ kam es in allen Versuchsgruppen zu einem sprunghaften Anstieg der biomechanischen Kapazitäten des Knochen-Transplantat-Knochen-Komplexes. Den größten Anstieg hatte hierbei die Gruppe C.

Die erreichte Ausrissfestigkeit der Gruppe C von 70,1 % des vorderen Kreuzbandes liegt weit über denen, die bisher für Kreuzbandtransplantate in Tiermodellen berichtet wurden (BALLOCK et al. 1989, FROMM 1996, KATSURAGI et al. 2000, YOSHIHA 1987).

Es ist zu vermuten, dass durch die Transplantatbearbeitung im Sinne des „splittings“ der Kollagenfasern eine verbesserte Ernährungsgrundlage für den Umbau der Transplantate geschaffen wurde. Im Weiteren könnte durch die Manipulation der Transplantate eine erhöhte reparative Aktivität induziert worden sein, die im Endprodukt ein belastungsstabileres Transplantat erzielt haben. Anders als in Läsionsmodellen am Bandapparat erfolgte durch das Splitten keine Strukturzerstörung quer zu den Kollagenfibrillen, sondern lediglich eine strukturelle Auflockerung der dicht gepackten Fasern. Die Veränderungen sind somit nicht mit Ruptursituationen zu vergleichen, die nachweislich in der Reparation dünnere Kollagenfibrillen mit geringerer mechanischer Belastbarkeit entwickeln (FRANK et al. 1997).

Weitere Veränderungen nach der 32. postoperativen Woche hinsichtlich der biomechanischen Parameter waren nur von geringfügigen Erhöhungen geprägt.

Die wesentlichen Transplantatumbauprozesse für die biomechanische Belastbarkeit der Transplantate sind bereits nach 32 Wochen abgeschlossen. Die biomechanischen Charakteristika der Transplantate nach 56 Wochen waren den mechanischen

Eigenschaften des physiologischen vorderen Kreuzbandes weit unterlegen. Die erreichten Werte der Operationsgruppen für die maximale Ausrissfestigkeit von 54,9 – 77,7 % und der Steifigkeit von 71,4 – 81,8 % des vorderen Kreuzbandes sind Ausdruck eines unvollständigen Transplantat-umbaus.

Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation des Faktor XIII, insbesondere in der Frühphase, die mechanische Festigkeit des Knochen-Transplantat-Knochen-Komplexes verbessert, jedoch langfristig es zu keiner Verbesserung der mechanischen Qualität kommt. Dagegen scheint die gewählte Operationstechnik im Sinne der Patellarsehnen-Splitting-Technik in Kombination mit der Faktor XIII-Applikation einen weit größeren Einfluss auf die langfristigen biomechanischen Eigenschaften der Transplantate zu besitzen.

8.7 Zusammenfassende Diskussion

Unter Berücksichtigung aller Einzelergebnisse konnte in der durchgeführten Studie gezeigt werden, dass eine Faktor XIII Gabe oder die Kombination mit einer veränderten Transplantataufbereitung wesentlich den Transplantatein- und umbau beeinflussen kann. Die dynamischen Veränderungen des Einwachsverhaltens konnten stimuliert und die biomechanischen Parameter im Vergleich zu einer sogenannten Standardversorgung verbessert werden. Die markanten Veränderungen, denen ein Patellarsehnentransplantat unterliegt, um die morphologischen und biomechanischen Eigenschaften eines vorderen Kreuzbandes zu erreichen, konnten mit den eingesetzten Methoden nur näherungsweise beeinflusst werden. Ursachen hierfür sind die heterotope Transplantation eines primär extraartikulär gelegenen Transplantates in das intraartikuläre System. Die signifikanten histomorphometrischen und biochemischen Unterschiede des Patellarsehnentransplantates im Vergleich zum vorderen Kreuzbandes können auch nach mehr als einem Jahr nicht vollständig angeglichen werden. Obwohl das Patellarsehnen-transplantat strukturell hinsichtlich seiner Kollagenfibrillenarchitektur und seiner bekannten biomechanischen Daten dem vorderen Kreuzband überlegen ist, erreicht dieses Transplantat nach abgelaufenem Umbauprozess nur maximal 3/4 der biomechanischen Leistungsfähigkeit des vorderen Kreuzbandes. Die auffälligsten Veränderungen weisen die Kollagenzusammensetzung, die Kollagenfibrillenstärke und -verteilung sowie die veränderte Ratio der nichtreduzierbaren Querbrücken auf.

Valide Parameter zur Einschätzung der biomechanischen Eigenschaften sind die Zellularität, die Vaskularität, die Pyridinolinkonzentration, die Kollagen-Typ III Konzentration und die Kollagenfibrillenmorphometrie.

Zwar verändern sich die morphologischen und biochemischen Charakteristika der Transplantate in Richtung der Eigenschaften des vorderen Kreuzbandes, sie zeigen

aber zum Teil noch nach über einem Jahr signifikante Unterschiede. Der Prozess der Ligamentisation ist demzufolge unvollständig und der Begriff fehlorientierend.

Zahlreiche unbekannte Faktoren konnten nicht oder können noch nicht berücksichtigt werden. Die Wirkung und Interaktion von Proteoglykanen, Wachstumsfaktoren, die intrinsische Aktivität der Fibroblasten und die zellulären Eigenschaften von genetisch determiniertem Bindegewebe, welches als Kreuzbandersatz genutzt wird, bedürfen weiterer Studien.

9. Zusammenfassung und Perspektiven

In der vorliegenden Untersuchung zum Einwachsverhalten einer autologen vorderen Kreuzbandplastik am Kaninchenmodell konnte der Einfluss und die Wirkung von manipulativ wirkenden Faktoren auf die Ausbildung eines stabilen Bindegewebsregenerates belegt werden. Sowohl der fibrinstabilisierende Faktor XIII als auch die eingesetzte Transplantat-Splitting-Technik zeigten eine positive Wirkung auf den Ein- und Umbau sowie den biomechanischen Ausrissfestigkeiten der Transplantate.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich durch den operativen Eingriff die Faktor XIII-Plasmakonzentration signifikant verringerte und ohne Substitution erst nach 14 Tagen eine Normalisierung des Plasmaspiegels auftrat. Durch eine frühzeitige Substitutionstherapie wurde ein physiologischer Plasma-spiegel bereits 3 Tage nach der Operation erreicht.

Die Einsprossung von Fibroblasten und Osteoblasten im physiologischen Ablauf der Bindegewebsheilung mit Vernetzung der Fibrin-Kollagen-Matrix wird durch die Faktor XIII-Konzentration unterstützt. Die Transplantate zeigten in Abhängigkeit der Faktor XIII-Konzentration signifikante zellulär-morphologische Veränderungen. Die ossäre Integration der Knochenblöcke von den Transplantaten wurde durch die frühzeitige Faktor XIII-Gabe stimuliert und zeigte sich in einer erhöhten Ausrissfestigkeit. Es erscheint aus diesem Grund die Normalisierung des Faktor XIII-Spiegels als ein wesentlicher Parameter bei der Bindegewebsheilung.

Die neuartig entwickelte Transplantat-Splitting-Technik erwies sich für den Transplantatumbau als vorteilhaft. Eine Schwächung der mechanischen Belastbarkeit durch das Spalten der Kollagenfasern wurde nicht beobachtet. Mit dieser Transplantatbearbeitung wurde die Grundlage für eine frühzeitige synoviale Ernährung der Bündel gewährleistet. Durch die artifizielle Gewebsläsion werden reparative Vorgänge beschleunigt.

Die alleinige Wirkung des Faktor XIII spielt vor allem in der Frühphase eine stimulierende Rolle auf die Initiierung der Umbauvorgänge und der ossären Intergration der Knochenblöcke. Mittel- und langfristig wird die Ausbildung von belastungsstabilen Kollagenfibrillen durch andere weitestgehend unbekannte Einflussfaktoren bestimmt.

Die Kombination der Faktor XIII-Gabe mit der Transplantat-Splitting-Technik zeigte in der Langzeitbeobachtung die signifikant höchste mechanische Festigkeit.

Obwohl die Transplantate einem erheblichen morphologischen und biochemischen Umbauprozess unterliegen, konnten auch durch Einsatz der Transplantat-Splitting-Technik und der Faktor XIII Gabe nur etwa 3/4 der maximalen mechanischen Ausrissfestigkeit des vorderen Kreuzbandes erreicht werden. Welche Mechanismen die Ausbildung von dünnen Kollagenfibrillen, veränderter Konzentrationen an nichtreduzierbaren Quervernetzungen und vermehrter Kollagen-Typ III Expression fördern, ist weiterhin unklar und bleibt Aufgabe zukünftiger wissenschaftlicher Untersuchungen.

Für die klinische Praxis können folgende Schlussfolgerungen formuliert werden:

Die Standardversorgung des vorderen Kreuzbandersatzes, wie sie erstmalig von CAMPBELL (1939) mit einem frei transplantierten zentralen Patellar-sehnenstreifen beschrieben wurde, unterliegt einer Kaskade von morpho-logischen Veränderungen, die als Endresultat ein kreuzbandähnliches Substrat bildet. Die vergleichende experimentelle Untersuchung konnte zeigen, dass der Einsatz von Faktor XIII in der postoperativen Frühphase die Umbauvorgänge stimulieren und die mechanische Ausrissfestigkeit erhöhen kann. Es stellt sich natürlich die Frage, ob ein routinemäßiger Einsatz dieses humanen Plasmakonzentrates gerechtfertigt ist. Sowohl die hohen Kosten als auch die Restgefahr der Übertragung von infektiösen Krankheiten relativiert den Aufwand und Nutzen. Jedoch können labormedizinische Kontrollen der Plasma XIII-Konzentration einen Hinweis auf erworbene Faktor-XIII-Mangelsyndrome objektivieren, die im Einzelfall eine Substitutionstherapie rechtfertigen.

Perspektivisch könnte sich jedoch mit einem hochpurifizierten rekombinant hergestellten Präparat eine klinische Relevanz ergeben. Der entsprechende Wirkungsnachweis unter systemischer Applikation konnte erbracht werden.

Die eingesetzte Transplantat-Splitting-Technik ist eine einfach durchführbare Technik, welche die Transplantatumbauprozesse unterstützt. Durch diese Transplantatpräparation wird die Oberfläche der Transplantate vergrößert und die Ernährung verbessert. Es konnte experimentell belegt werden, dass keine nennenswerte biomechanische Schwächung in der Frühphase auftritt, jedoch eine deutlich erhöhte Zellinfiltration und Zellmigration resultiert. Langfristig konnte biomechanisch durch diesen manipulativen Eingriff die größte Annäherung an das vordere Kreuzband erreicht werden. Auf der Grundlage der experimentell gewonnenen Daten kann die Transplantat-Splitting-Technik für die klinische Erprobung und Praxiseinführung empfohlen werden.

Die Zukunft der modernen Kreuzbandchirurgie wird auf dem Gebiet der zellulär-molekularen Ebene sein. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen ergaben neue therapeutische Ansätze, wie die externe Applikation von Wachstumsfaktoren (MAURI et al. 1997, SCHERPING et al. 1997, SCHMIDT et al. 1995), die Gentransfertechnik zur endogenen Produktion von Wachstumsfaktoren (HILDEBRAND et al. 1999, MENETREY et al. 1999) und der selektiven Blockade der die Fibrollogenese hemmenden Proteoglykane (NAKAMURA et al. (2000) oder die mesenchymale Stammzelltherapie (WATANABE et al. 1998, YOUNG et al. 1998).

Die Entdeckung neuer Rezeptoren, wie des Östrogenrezeptors auf den Fibroblasten des vorderen Kreuzbandes (LIU et al. 1996) und dem Nachweis einer hormonellen Beeinflussung des Zellmetabolismus, ergeben neue Erklärungen des Einflusses von endogen und exogen verursachten Hormonschwankungen auf das Heilungspotential von Kreuzbandtrans-plantaten (YU et al. 1999, LIU et al. 1996, LIU et al. 1997).

Die Bindegewebsheilung von Sehnen und Bändern wird von einer Vielzahl von Einflussfaktoren bestimmt. Diese werden von genetisch determinierten Eigenschaften des Bindegewebes jedes Individuums selbst (GROOD et al. 1998), der Ausbildung von verschiedensten Rezeptoren der Wachstums-regulation (PANOSSIAN et al. 1997, SCIORE et al. 1998), den chemotaktischen Effekten der Zytokine (HANNAFIN et al. 1997) und der exogenen Wirkung von zyklischen Belastungen auf die Fibroblasten (HSIEH et al. 2000, ZEICHEN et al. 1999) bestimmt.

Es ist die Aufgabe zukünftiger wissenschaftlicher Grundlagenforschung die einzelnen Parameter hinsichtlich ihrer dominierende Rolle im Binde-gewebsstoffwechsel zu definieren und selektiv durch verschiedenste Methoden ihre Wirkung zu stimulieren oder zu hemmen, so dass sich als Endprodukt ein zeitbeständiges belastungsstabiles Regenerat ausbildet (WOO et al. 1999).

Mit der Weiterentwicklung des tissue engineering erscheint es perspektivisch möglich aus autologen humanen Fibroblasten rupturierter Kreuzbänder, in-vitro auf einer dreidimensionalen Matrix ein Band zu züchten, welches dem originären Kreuzband hinsichtlich seiner morphologischen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften entspricht und zu einem beliebigen Zeitpunkt retransplantiert werden kann.

Erste in-vitro Versuche zum Migrationsverhalten von humanen Fibroblasten in einem Kollagen-Glycosaminoglykan-Netz sind bereits erfolgreich durchgeführt worden (MURRAY et al. 2000).

Die vorliegenden Untersuchungen waren ein wissenschaftlicher Beitrag auf dem Gebiet der Bindegewebsforschung und der vorderen Kreuzband-chirurgie um dem Ziel, welches ERIKSSON bereits 1997 formulierte, ein kleines Stück näher zu kommen:

*„I am waiting for the day when we can promise our ACL patients a
95-100 % chance of obtaining a stable, well-functioning knee that allows them to go
back to their original sport at the same level as before their injury. Let us strive to
achieve this.“*

Ejnar Eriksson, Stockholm 1997

10. Literaturverzeichnis

1. ABIEZZI SS, GESINK DS, SCHRECK PJ, AMIEL D, AKESON WH, WOODS VL JR. : Increased expression of the beta 1, alpha 5, and alpha v integrin adhesion receptor subunits occurs coincident with remodeling stress-deprived rabbit anterior cruciate and collateral ligaments. *J Orthop Res* (1995) **13** : 594-601
2. ADACHI E, HAYASHI T : In vitro formation of hybrid fibril of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect Tissue Res* (1986) **14** : 257-266
3. AESCHLIMANN D, PAULSSON M : Transglutaminases : protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb Haemost* (1994) **71** : 402-415
4. AGLIETTI P, ZACCHEROTTI G, MENCHETTI PP, DE BIASE P : A comparison of clinical and radiological parameters with two arthroscopic techniques for anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1995) **3** : 2-8
5. AGLIETTI P, BUZZI R, GIRON F, SIMEONE AJ, ZACHEROTTI G : Arthroscopic-assisted anterior cruciate ligament reconstruction with the central third patellar tendon. A 5- 8- years follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1997) **5** : 138-144
6. AMIEL D, WOO SL, HARWOOD FL, AKENSON WH : The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue : a biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scand* (1982) **53** : 325-332
7. AMIEL D, FRANK C, HARWOOD F, FRONEK J, AKESON W : Tendons and ligaments : a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* (1984) **1** : 257-265
8. AMIEL D, ABEL MF, KLEINER JB, LIEBER RL, AKESON WH : Synovial fluid nutrient delivery in the diarthral joint : an analysis of rabbit knee ligaments. *J Orthop Res* (1986a) **4** : 90-95
9. AMIEL D, KLEINER JB, ROUX RD, HARWOOD FL, AKESON WH : The phenomenon of "ligamentization" : anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res* (1986b) **4** : 162-172
10. AMIEL D, KLEINER JB, AKESON WH : The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin. *Am J Sports Med* (1986c) **14** : 449-462

11. AMIEL D, BILLINGS E JR, HARWOOD FL : Collagenase activity in anterior cruciate ligament : protective role of the synovial sheath. *J Appl Physiol* (1990) **69** : 902-906
12. AMIEL D, NIMNI ME : The collagen in normal ligaments. *Iowa Orthop J* (1993) **13** : 49-55
13. AMIS AA, BEYNNON B, BLANKEVOORT L, CHAMBAT P, CHRISTEL P, DURSELEN L, FRIEDERICH N, GROOD E, HERTEL P, JAKOB R ET AL. : Proceedings of the ESSKA Scientific Workshop on Reconstruction of the Anterior and Posterior Cruciate Ligaments. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1994) **2** : 124-132
14. AMIS AA, JACOB RP : Anterior cruciate ligament graft positioning, tensioning and twisting. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1998) **6 (Suppl 1)** : S2-S12
15. AMENTA PS, GIL J, MARTINEZ-HERNANDEZ A : Connective tissue of rat lung. II : Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. *J Histochem Cytochem* (1988) **36** : 1167-1173
16. ASAHINA S, MUNETA T, ISHIBASHI T, YAMAMOTO H : Effects of knee flexion angle at graft fixation on the outcome of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* (1996) **12** : 70-75
17. AZANGWE G, MATHIAS KJ, MARSHALL D : Macro and mircroscopic examination of the ruptured surfaces of anterior cruciate ligaments of rabbits. *J Bone Joint Surg Br* (2000) **82** : 450 - 456
18. BALLOCK RT, WOO SL, LYON RM, HOLLIS JM, AKESON WH : Use of patellar tendon autograft for anterior cruciate ligament reconstruction in the rabbit : a long-term histologic and biomechanical study. *J Orthop Res* (1989) **7** : 474-485
19. BAEK GH, CARLIN GJ, VOGRIN TM, WOO SL, HARNER CD : Quantitative analysis of collagen fibrils of human cruciate and meniscofemoral ligaments. *Clin Orthop* (1998) **357** : 205-211
20. BARTHELS M, SEEKAMP A, LUMMERT U, SCHARFENBERG J, OSTERREICH C, GROTE L, POLIWODA H : Factor XIII A2/B2 ratio in relation to tissue damage after surgery and after polytrauma. In : *Factor XIII*, Schattauer, Stuttgart-New York (1993) pp 262-265
21. BECK E, DUCKERT F, ERNST M : The influence of fibrin stabilizing factor on the growth of fibroblasts in vitro and wound healing. *Thromb Diath Haemorrh* (1961) **6** : 485-489

-
22. BERGSTROM R, HAMBERG P, LYSHOLM J, GILLQUIST J : Comparison of open and endoscopic meniscectomy. Clin Orthop (1984) **184** : 133-136
23. BERNARD M, HERTEL P : Die intraoperative und postoperative Insertionskontrolle bei vorderen Kreuzbandplastiken. Ein radiologisches Mess-verfahren. Unfallchirurg (1996) **99** : 332-340
24. BIEHL H, BOHN H, RONNEBERGER H, ZWISLER O : Beschleunigung der Wundheilung durch Faktor XIII der Blutgerinnung. Arzneimittelforschung (1971) **21** : 1429-1430
25. BINKLEY JM, PEAT M : The effects of immobilization on the ultrastructure and mechanical properties of the medial collateral ligament of rats. Clin Orthop (1986) **203** : 301-308
26. BISHOP PD, TELLER DC, SMITH RA, LASSER GW, GILBERT T, SEALE RL : Expression, purification and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry (1990) **29** : 1861-1869
27. BJELLQVIST B, PASQUALI C, RAVIER F, SANCHEZ JC, HOCHSTRASSER D : A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. Electrophoresis (1993) **14** : 1357-1365
28. BLACKBURNE JS, PEEL TE : A new method of measuring patellar height. J Bone Joint Surg Br (1977) **59-B** : 241-242
29. BLICKENSTAFF KR, GRANA WA, EGLE D : Analysis of semitendinosus autograft in a rabbit model. Am J Sports Med (1997) **25** : 554-559
30. BLÜMEL J, KOHNLEIN HE, KRIEG G, KUTSCHERA H : Faktor-XIII-Substitution und Wundreißfestigkeit. Langenbecks Arch Chir (1974) **Suppl** : 245-248
31. BOHN H, EMMERICH F : Process for isolating fibrin-stabilizing factor. US-Patent (1976) **3** : 931-939
32. BOLLEN S, SEEDHOM BB : A comparison of the Lysholm and Cincinnati knee scoring questionnaires. Am J Sports Med (1991) **19** : 189-190
33. BORNSTEIN P, PIEZ KA : The nature of the intramolecular cross-links in collagen. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen. Biochemistry (1966) **5** : 3460-3473

34. BOSCH U, KASPERCZYK W, OESTERN HJ, TSCHERNE H : Hinterer Kreuzbandersatz - Makroradiographische und histologische Untersuchungen in der Frühphase der Einheilung eines Patellarsehnentransplantates (PST) bei frühfunktioneller Nachbe-handlung. *Langenbecks Arch Chir* (1988) **Suppl Chir Forum** : 177-180
35. BOSCH U, DECKER B, KASPERCZYK W, OESTERN HJ, TSCHERNE H : Biological aspects of long-term failure of autografts after cruciate ligament replacement. *Arch OrthopTrauma Surg* (1989) **108** : 368-372
36. BOSCH U, KASPERCZYK W, OESTERN HJ, TSCHERNE, H : Die Einheilungsphasen beim autogenen hinteren Kreuzbandersatz. Entscheidungshilfen für die Nachbehandlung. Eine biomechanische und histologische Studie. *Unfallchirurg* (1990) **93** : 187-196
37. BOSCH U, DECKER B, MOLLER HD, KASPERCZYK WJ, OESTERN HJ : Collagen fibril organization in the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction. A quantitative evaluation in a sheep model. *Am J Sports Med* (1995) **23** : 196-202
38. BOSCH U, GASSLER N, DECKER B : Alterations of glycosaminoglycans during patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament replacement. A biochemical study in a sheep model. *Am J Sports Med* (1998) **26** : 103-108
39. BOYKIW R, SCIORE P, RENO C, MARCHUK L, FRANK CB, HART DA : Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligament. *Matrix Biol* (1998) **17** : 371-378
40. BRADLEY J, FITZPATRICK D, DANIEL D, SHERCLIFF T, O'CONNORJ : Orientation of the cruciate ligament in the sagittal plane. A method of predicting its length-change with flexion. *J Bone Joint Surg Br* (1988) **70** : 94-99
41. BRAY DF, FRANK CB, BRAY RC : Cytochemical evidence for a proteoglycan-associated filamentous network in ligament extracellular matrix. *J Orthop Res* (1990) **8** : 1-12
42. BRAY DF, FRANK CB, BRAY RC : Ultrastructural immunolocalization of type-VI collagen and chondroitin sulphate in ligament. *J Orthop Res* (1993) **11** : 677-685
43. BROCKMEIER SJ, ARNOLD W : Erfahrungen mit Faktor XIII bei Wundheilungsstörungen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : *Klinische Aspekte des Faktor XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung.* Basel, Karger, 1999, pp 147-154

-
44. BRÖKER M, KARGES HE : Expression of human factor XIIIa in yeast. *Yeast* (1988) **4** : 142-148
45. BROWN LF, LANIR N, MCDONAGH J, TOGNAZZI K, DVORAK AM, DVORAK HF : Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am J Pathol* (1993) **142** : 273-283
46. BRÜCK E, ZIRING E, GIANNADAKIS C, GOTZEN L : Zur Morbidität nach kontralateraler Entnahme des Lig.-patellae-Transplantates zum Kreuzbandersatz. *Unfallchirurg* (1998) **101** : 775-778
47. BRUHN HD : Faktor XIII, Thrombin und Fibronectin als Regulatoren der Fibroblastenproliferation bei Wundheilung. *Hämostasiologie* (1983) **1** : 24
48. BURRI C, PÄSSLER HH, RADDE J : Experimentelle Grundlagen zur funktionellen Behandlung nach Bandnaht und -plastik am Kniegelenk. *Z Orthop* (1973) **111** : 378-379
49. BURRI C, HELBING C, RÜTER A : Die Behandlung der posttraumatischen Bandinstabilität am Kniegelenk. *Orthopäde* (1974) **3** : 184-192
50. BYLSKI-AUSTROW DI, GROOD ES, HEFZY MS, HOLDEN JP, BUTLER DL : Anterior cruciate ligament replacements : A mechanical study of femoral attachment location, flexion angle at tensioning, and initial tension. *J Orthop Res* (1990) **8** : 522-531
51. CAMPA JS, MCANULTY RJ, LAURENT GJ : Application of high-pressure liquid chromatography to studies of collagen production by isolated cells in culture. *Anal Biochem* (1990) **186** : 257-263
52. CAMPBELL WC : Reconstruction of the ligaments of the knee. *Am J Surg* (1939) **43** : 473-480
53. CHAN D, COLE WG : Quantitation of type I and III collagens using electrophoresis of alpha chains and cyanogen bromide peptides. *Anal Biochem* (1984) **139** : 322-328
54. CHAN BP, FU SC, QIN L, ROLF C, CHAN KM : Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing : an animal study. *J Orthop Res* (1998) **16** : 597-603
55. CAO M, STEFANOVIC-RACIC M, GEORGESCU HI, FU FU, EVANS CH : Does nitric oxide help explain the differential healing capacity of the anterior cruciate, posterior cruciate, and medial collateral ligaments? *Am J Sports Med* (2000) **28** : 176-182

56. CHAOUI K, ZIEMER S, LAMMERT H, LAMMERT I : Faktor-XIII-Prophylaxe und deren Einfluß auf Wundheilungsstörungen nach Tumorresektion im Kopf-Hals-Bereich. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp 158-165
57. CHIROFF RT : Experimental replacement of the anterior cruciate ligament. A histological and microradiographic study. J Bone Joint Surg Am (1975) **57** : 1124-1127
58. CHRISTEL PS, GIBBONS DF : Collagen fiber changes in the exercised, immobilized, or injured anterior cruciate ligament. In : Jackson DW (ed) . The anterior cruciate ligament : Current and future concepts. New York. Raven Press 1993 : pp 195-208
59. CHUNG E, KEELE EM, MILLER EJ : Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the alpha 1(3) chain of human collagen. Biochemistry (1974) **13** : 3459-3464
60. CLAES L, KUGELMEIER K, GERNGROß H : Experimentelle Untersuchungen zur mitogenen Wirkung von Faktor XIII auf Osteoblasten. Hefte Unfallheilkd (1987) **189** : 153-156
61. CLAES L, BOCH W, WILKE HJ, LAULE A, GERNGROß H : Beschleunigung der Kallusbildung und Kallusreifung durch Faktor-XIII-Gaben. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp 173-183
62. CLANCY WG JR, NARECHANIA RG, ROSENBERG TD, GMEINER JG, WISNEFSKE DD, LANGE TA : Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys. J Bone Joint Surg Am (1981) **63** : 1270-1284
63. COLE WG, BEAN DA : Analysis of collagen cyanogen bromide peptides using electrophoresis in continuous concave gradient polyacrylamide gels. Anal Biochem (1979) **92** : 183-188
64. CRAIG AS, EIKENBERRY EF, PARRY DA : Ultrastructural organization of skin : classification on the basis of mechanical role. Connect Tissue Res (1987) **16** : 213-223
65. CUNNINGHAM KD, MUSANI F, HART DA, SHRIVE NG, FRANK CB : Collagenase degradation decreases collagen fibril diameters – an in vitro study of the rabbit medial collateral ligament. Connect Tissue Res (1999) **40** : 67-74

66. DAHNERS LE, LESTER GE, CAPRISE P : The pentapeptide NKISK affects collagen fibril interactions in a vertebrate tissue. *J Orthop Res* (2000) **18** : 532-536
67. DANIEL DM, STONE ML, SACHS R, MALCOM L : Instrumented measurement of anterior knee laxity in patients with acute anterior cruciate ligament disruption. *Am J Sports Med* (1985) **13** : 401-407
68. DANYLCHUK KD, FINLAY JB, KRCEK JB : Microstructural organization of human and bovine cruciate ligaments. *Clin Orthop* (1978) **131** : 294-298
69. DAVIDS H, HODEL D : Faktor-XIII-Einsatz bei Wundheilungsstörungen nach ausgedehnten Tumoresektionen im Kopf-Hals-Bereich. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung.* Basel, Karger, 1999, pp 155-157
70. DECKER B, BOSCH U, KASPERCZYK W, OESTERN HJ : Late ultrastructural changes of the extracellular matrix of the patellar tendon used as a cruciate ligament substitute. *Eur J Cell Biol* (1990) **51, Suppl 30** : 69-76
71. DECKER B, BOSCH U, KASPERCZYK W, OESTERN HJ, REALE E : Ultrastructural changes of the patellar tendon as a cruciate ligament substitute (one and two year results). *J Submicrosc Cytol Pathol* (1991) **23** : 9-21
72. DIEKSTALL P, RAUHUT F : Überlegungen zur Differentialindikation der vorderen Kreuzbandplastik. *Unfallchirurg* (1999) **102** : 173-181
73. DUCKERT F, JUNG E, SHMERLING DH : A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. *Thromb Diath Haemorrh* (1960) **5** : 179-186
74. EBERHARDT C, KURTH AH, HAILER N, JÄGER A : Revision ACL reconstruction using autogenous patellar tendon graft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2000) **8** : 290-295
75. ENGELHARDT GH, NAGELSCHMIDT M, JANSEN H : Faktor XIII und Bindegewebsstoffwechsel während der Wundheilung. In : *Gerinnungsfaktor XIII.* Brückner WL (Ed.), Urban-Schwarzenberg 1983 : pp 95-104
76. ENGVALL E, PERLMAN P : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* (1971) **8** : 871-874
77. EPSTEIN EH JR. : (Alpha1(3)) 3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem* (1974) **249** : 3225-3231

78. ERLEBACH R, HARTUNG HJ : Einsatz von Faktor XIII bei Schwerstbrand-verletzten. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp 89-92
79. EYRE DR, PAZ MA, GALLOP PM : Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* (1984a) **53** : 717-748
80. EYRE DR, KOOB TJ, VAN NESS KP : Quantitation of hydroxypyridinium cross-links in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* (1984b) **137** : 380-388
81. FAN L, SARKAR K, FRANKS DJ, UHTHOFF HK : Estimation of total collagen and types I and III collagen in canine rotator cuff tendons. *Calcif Tissue Int* (1997) **61** : 223-229
82. FAIRBANK TJ : Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* (1948) **30** : 164-170
83. FISHER S, RIKOVER M, NAOR S : Factor XIII deficiency with severe hemorrhagic diathesis. *Blood* (1966) **28** : 34-39
84. FLANDRY F, HUNT JP, TERRY GC, HUGHSTON JC : Analysis of subjective knee complaints using visual analog scales. *Am J Sports Med* (1991) **19** : 112-118
85. FLEMING BC, BEYNNON BD, JOHNSON RJ, MCLEOD WD, POPE MH : Isometric versus tension measurements. A comparison for the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* (1993) **21** : 82-88
86. FLEMING BC, BEYNNON BD, NICHOLS CE, JOHNSON RJ, POPE MH : An in vivo comparison between intraoperative isometric measurement and local elongation of the graft after reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* (1994) **76** : 511-519
87. FLEISCHMAJER R, PERLISH JS, BURGESSON RE, SHAIKH-BAHAI F, TIMPL R : Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann NY Acad Sci* (1990) **580** : 161-175
88. FLINT MH, CRAIG AS, REILLY HC, GILLARD GC, PARRY DA : Collagen fibril diameters and glycosaminoglycan content of skins : Indices of tissue maturity and function. *Connect Tissue Res* (1984) **13** : 69-81
89. FLORIDI A, IPPOLITO E, POSTACCHINI F : Age-related changes in the metabolism of tendon cells. *Connect Tissue Res* (1981) **9** : 95-97

-
90. FOLKMAN J, KLAGSBRUN M : Angiogenic factors. *Science* (1987) **235** : 442-447
91. FRANK C, MCDONALD D, LIEBER P, SABISTON E : Biochemical heterogeneity within the maturing rabbit medial collateral ligament. *Clin Orthop* (1988) **226** : 279-285
92. FRANK C, MCDONALD D, WILSON J, EYRE D, SHRIVE N : Rabbit medial collateral ligament scar weakness is associated with decreased collagen pyridinoline crosslink density. *J Orthop Res* (1995) **13** : 157-165
93. FRANK C, MCDONALD D, SHRIVE N : Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar : a longer term assessment. *Connect Tissue Res* (1997) **36** : 291-269
94. FRANK CB, HART DA, SHRIVE NG : Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments – a review. *Osteoarthritis Cartilage* (1999) **7** : 130-140
95. FRASER WD : The collagen crosslinks pyridinoline and deoxypyridinoline : A review of their biochemistry, physiology, measurement and clinical applications. *J Clin Ligand Assay* (1998) **21** : 102-110
96. FROMM B : Die allogene Transplantation des vorderen Kreuzbandes. Eine biomechanische, mikrovaskuläre und immunhistochemische Untersuchung. *Hefte zur Zeitschrift „Der Unfallchirurg“* (1994) **245** : 1-113 Springer Verlag
97. FROMM B, SCHÄFER B, PARSCH D, KUMMER W : Reconstruction of the anterior cruciate ligament with a cryopreserved ACL allograft. A microangiographic and immunohistochemical study in rabbits. *Int Orthop* (1996) **20** : 378-382
98. FUJII K, YAMAGISHI T, NAGAFUCHI T, TSUJI M, KUBOKI Y : Biochemical properties of collagen from ligaments and periarticular tendons of the human knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1994) **2** : 229-233
99. FUJIMOTO D, MORIGUCHI T : Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. Quantitative determination, distribution, and isolation of a crosslinked peptide. *J Biochem (Tokyo)*. (1978) **83** : 863-867
100. FUKUBAYASHI T, KUROSAWA H : The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints. *Acta Orthop Scand* (1980) **51** : 871-879
101. GAMBLE JG, EDWARDS CC, MAX S : Enzymatic adaptation in ligaments during immobilization. *Am J Sports Med* (1984) **12** : 221-228

-
102. GERNGROSS H, STEINMANN R, GRAF K : Faktor XIII und Knochenheilung. *Med Welt* (1987) **38** : 1533-1539
103. GILLQUIST J, MESSNER K : Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis. *Sports Med* (1999) **27** : 143-156
104. GINSBURG JH, WHITESIDE LA, PIPER TL : Nutrient pathways in transferred patellar tendon used for anterior cruciate ligament reconstruction *Am J Sports Med* (1980) **8** : 15-18
105. GOERTZEN MJ, BUITKAMP J, CLAHSSEN H, MÖLLMANN M : Cell survival following bone-anterior cruciate ligament-bone allograft transplan-tation : DNA fingerprints, segregation, and collagen morphological analysis of multiple markers in the canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* (1998) **117** : 208-214
106. GRAF B, UHR F : Complications of intra-articular anterior cruciate reconstruction. *Clin Sports Med* (1988) **7** : 835-848
107. GRANA WA, EGGLE DM, MAHNKEN R, GOODHART CW : An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med* (1994) **22** : 344-351
108. GREENHALGH DG, SPRUGEL KH, MURRAY MJ, ROSS R : PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol* (1990) **136** : 1235-1246
109. GRONTVEDT T, ENGBRETSSEN L, BENUM P, FASTING O, MOLSTER A, STRAND T. A prospective, randomized study of three operations for acute rupture of the anterior cruciate ligament. Five-year follow-up of one hundred and thirty-one patients. *J Bone Joint Surg Am* (1996) **78** : 159-168
110. GROOM ES, CUMMINGS JF, LEVY M, NOYES FR : Subject determines the outcome of ACL reconstruction : Studies in the goat model. 8th Congress, European Society of Sports Traumatology Knee Surgery and Arthroscopy, 29. 04. -02. 05. 1998, Nice, France
111. GUZZANTI V, FALCIGLIA F, GIGANTE A, FABBRICIANI C : The effect of intra-articular ACL reconstruction on the growth plates of rabbits. *J Bone Joint Surg Br* (1994) **76** : 960-963
112. HANNAFIN JA, ATTIA E, WARREN RF, BHARGAVA MM : The effect of cytokines on the chemotactic migration of canine knee ligament fibro-blasts. *Trans Orthop Res Soc* (1997) **22** : 50

113. HANSON AN, BENTLEY JP : Quantitation of type I to type III collagen ratios in small samples of human tendon, blood vessels, and atherosclerotic plaque. *Anal Biochem* (1983) **130** : 32-40
114. HANSON DA, WEIS MA, BOLLEN AM, MASLAN SL, SINGER FR, EYRE DR : A specific immunoassay for monitoring human bone resorption : quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* (1992) **7** : 1251-1258
115. HARNER CD, MARKS PH, FU FH, IRRGANG JJ, SILBY MB, MENGATO R : Anterior cruciate ligament reconstruction : endoscopic versus two-incision technique. *Arthroscopy* (1994) **10** : 502-512
116. HART RA, AKESON WH, SPRATT K, AMIEL D : Collagen fibril diameter distributions in rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments : changes with maturation. *Iowa Orthop J* (1999) **19** : 66-70
117. HARWOOD FL, AMIEL D : Differential metabolic responses of periarticular ligaments and tendon to joint immobilization. *J Appl Physiol* (1992) **72** : 1687-1691
118. HASHIMOTO Y, YOSHIHA S, KUROSAKA M, HIROHATA K : The revascularization process of devascularized anterior cruciate ligaments in dogs. *Jpn J Rheum Joint Surg* (1991) **10** : 105-114
119. HAUG H : Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. *Z Anat Entwicklungsgeschichte* (1955) **118** : 302-312
120. HAUS J, REFIOR HJ : Zur Anatomie und Histologie des vorderen Kreuzbandes *Orthop Praxis* (1988) **5** : 296-297
121. HEFTI FL, KRESS A, FASEL J, MORSCHER EW : Healing of the transected anterior cruciate ligament in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* (1991) **73** : 373-383
122. HEFTI F, MÜLLER W, JAKOB RP, STÄUBLI HU : Evaluation of the knee ligament injuries with the IKDC form. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1993) **1** : 226-234
123. HEFZY MS, GROOD ES, NOYES FR : Factors affecting the region of most isometric femoral attachments. Part II : The anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* (1989) **17** : 208-216
124. HEILMANN HH, LINDENHAYN K, WALTHER HU : Synovialvolumen gesunder und arthrotischer humaner Kniegelenke. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* (1996) **134** : 144-148

125. HELLIO LE GRAVERRAND M, EGGERER J, SCIORE P, RENO C, VIGNON E, OTTERNESS I, HART DA : Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissue : influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol* (2000) **19** : 431-441
126. HERTEL P, LAIS E, BERNARD M : Die optimale Therapie komplexer Bandverletzungen und ihre biomechanische Begründung. *Zentralbl Chir* (1989) **114** : 1489-1500
127. HERTEL P, WIDJAJA G, CIERPINSKI T. Die vordere Kreuzbandplastik mit dem medialen Patellarsehnendrittel-Technik und 10 Jahresergebnisse der Pressfit-Technik. *Hefte zur Zeitschrift „Der Unfallchirurg“* (1999) **275** : 245-246, Springer Verlag
128. HILDEBRAND KA, DEIE M, ALLEN CR, SMITH DW, GEORGESCU HI, EVANS CH, ROBBINS PD, WOO SL : Early expression of marker genes in the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments : the use of different viral vectors and the effects of injury. *J Orthop Res* (1999) **17** : 37-42
129. HODNY Z, SYROVY I : The interference of cysteine thiols in the detection of glycosylated and non-glycosylated proteins by modified silver staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods* (1993) **26** : 273-281
130. HÖHER J, MÜNSTER A, KLEIN J, EYPASCH E, TILING T : Validation and application of a subjective knee questionnaire. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1995) **3** : 26-33
131. HOLMES PF, JAMES SL, LARSON RL, SINGER KM, JONES DC. Retrospective direct comparison of three intraarticular anterior cruciate ligament reconstructions. *Am J Sports Med* (1991) **19** : 599-600
132. HOOGLAND T, HILLEN B : Intra-articular reconstruction of the anterior cruciate ligament. An experimental study of length changes in different ligament reconstructions. *Clin Orthop* (1984) **185** : 197-202
133. HOWE JG, JOHNSON RJ, KAPLAN MJ, FLEMING B, JARVINEN M : Anterior cruciate ligament reconstruction using quadriceps patellar tendon graft. Part I. Long-term followup. *Am J Sports Med* (1991) **19** : 447-457
134. HOWELL SM, CLARK JA : Tibial tunnel placement in anterior cruciate ligament reconstructions and graft impingement. *Clin Orthop* (1992) **283** : 187-195

135. HOWELL SM, BARAD SJ : Knee extension and its relationship to the slope of the intercondylar roof. Implications for positioning the tibial tunnel in anterior cruciate ligament reconstructions. *Am J Sports Med* (1995) **23** : 288-294
136. HOWELL SM : Principles for placing the tibial tunnel and avoiding roof impingement during reconstruction of a torn anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1998) **6 (Suppl 1)** : S49-S55
137. HOWELL SM, WALLACE MP, HULL ML, DEUTSCH ML : Evaluation of the single-incision arthroscopic technique for anterior cruciate ligament replacement. A study of tibial tunnel placement, intraoperative graft tension, and stability. *Am J Sports Med* (1999) **27** : 284-293
138. HSIEH AH, TSAI CM, MA QJ, LIN T, BANES AJ, VILLARREAL FJ, AKESON WH, SUNG KL : Time-dependent increases in type-III collagen gene expression in medial collateral ligament fibroblasts under cyclic strains. *J Orthop Res* (2000) **18** : 220-227
139. IOZZO RV : Matrix proteoglycans : from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* (1998) **67** : 609-652
140. IPPOLITO E, NATALI PG, POSTACCHINI F, ACCINNI L, DE MARTINO C : Morphological, immunological, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg Am* (1980) **62** : 583-598
141. ISHIZUE KK, LYON RM, AMIEL D, WOO SL : Acute hemarthrosis : a histological, biochemical, and biomechanical correlation of early effects on the anterior cruciate ligament in a rabbit model. *J Orthop Res* (1990) **8** : 548-554
142. JACKSON DW, GROOD ES, ARNOCZKY SP, BUTLER DL, SIMON TM : Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. *Am J Sports Med* (1987) **15** : 295-303
143. JACKSON DW, SCHAEFER RK : Cyclops syndrome : loss of extension following intra-articular anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* (1990) **6** : 171-178
144. JACKSON DW, GROOD ES, COHN BT, ARNOCZKY SP, CUMMINGS JF : The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am* (1991) **73** : 201-213

145. JACKSON DW, GROOD ES, GOLDSTEIN JD, ROSEN MA, KURZWEIL PR, CUMMINGS JF, SIMON TM : A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med* (1993) **21** : 176-185
146. JÄGER A : Impingement index : A tool to predict an intercondylar notch impingement after ACL reconstruction. In : 2nd Heidelberg ACL-Symposium – State of the Art 2000, Eds : Pässler HH, Thermann H, Johann Ambrosius Barth Verlag, 2000
147. JÄGER A, STARKER M, HERRESTHAL J : Kann die Meniskusrefixation die Arthroseentwicklung im Kniegelenk schützen? Langzeitresultate. *Zentralbl Chir* (2000) **125** : 532-535
148. JÄGER A, WELSCH F, KAPPLER C : Arthroskopischer vorderer Kreuzbandersatz mit dem Patellarsehnentransplantat : 10-Jahresergebnisse. 18. Kongress der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie. 21.-22. September 2001, Saarbrücken
149. JÄRVELÄ T, KANNUS P, JÄRVINEN M : Anterior cruciate ligament reconstruction in patients with or without accompanying injuries : A re-examination of subjects 5 to 9 years after reconstruction. *Arthroscopy* (2001) **17** : 818-825
150. JOHNSON RJ, KETTELKAMP DB, CLARK W, LEAVERTON P : Factors affecting late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* (1974) **56** : 719-729
151. JOHNSON RJ, ERIKSSON E, HÄGGMARK T, POPE MH : Five to ten-year follow-up evaluation after reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* (1984) 122-140
152. JOMHA NM, BORTON DC, CLINGELEFFER AJ, PINCZEWSKI LA : Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees. *Clin Orthop* (1999a) **358** : 188-193
153. JOMHA NM, PINCZEWSKI LA, CLINGELEFFER A, OTTO DD. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament with patellar-tendon autograft and interference screw fixation. The results at seven years. *J Bone Joint Surg Br* (1999b) **81** : 775-779
154. JÖRGENSEN U, SONNE-HOLM S, LAURIDSEN F, ROSENKLINT A : Long term follow up of meniscectomy in athletes. A prospective longitudinal study. *J Bone Joint Surg Br* (1987) **69** : 80-83

155. KANDA T, OCHI M, IKUTA Y : Adverse effects on rabbit anterior cruciate ligament after knee immobilization : changes in permeability of horseradish peroxidase. *Arch Orthop Trauma Surg* (1998) **117** : 307-311
156. KARGES HE, RAPP R : Production and virus safety of human F XIII concentrates. In : Fator XIII, Eds. McDonagh M, Seitz R, Egbring R, Schattauer, Stuttgart-New York, 1993, pp 66-76
157. KATSURAGI R, YASUDA K, TSUJINO J, KEIRA M, KANEDA K : The effect of unphysiologically high initial tension deteriorates the mechanical proper ties and histology of the in situ frozen canine anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* (2000) **28** : 47-56
158. KASPERCZYK WJ, BOSCH U, OESTERN HJ, TSCHERNE H : Heilungsphasen nach experimentellem Kreuzbandersatz mittels Patellarsehnen-transplantat - Biomechanische Aspekte. In : Henche R : Fortschritte in der Arthroskopie (1991) **7** : 7-9
159. KEENE DR, SAKAI LY, BÄCHINGER HP, BURGESSON RE : Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol* (1987) **105** : 2393-2402
160. KELLER RB : Outcomes Research in Orthopaedics. *J Am Acad Orthop Surg* (1993) **1** : 122-129
161. KENNEDY JC, ROTH JH, MENDENHALL HV, SANFORD JB : Intraarticular replacement in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *Am J Sports Med* (1980) **8** : 1-8
162. KHALFAYAN EE, SHARKEY PF, ALEXANDER AH, BRUCKNER JD, BYNUM EB : The relationship between tunnel placement and clinical results after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* (1996) **24** : 335-341
163. KIENAPFEL H, SWAIN R, HETTEL A, WILKE A, KOLLER M, GRISS P : Recombinant and nonrecombinant factor XIII and its effect on bone ingrowth and strength of fixation. *Arch Orthop Trauma Surg* (1997) **116** : 239-243
164. KIENAPFEL H, WILKE A, DÖRNER P, JÜRGENSEN , PRINZ H, HETTEL A, SWAIN R, GRISS P : Implantatverankerungsfestigkeit sowie Knocheneinwachsverhalten nach systemischer Gabe von rekombinanten Faktor XIII und Faktor XIII-Konzentrat. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* (1995) **133** : 394-400

165. KIRSCHNER H, BOLZ U, FRECH H : Heilung von Zahnextraktionswunden bei lokaler und systemischer Anwendung von Plasmafaktor XIII im Tierexperiment. Dtsch Zahnärztl Z (1977) **32** : 676-679
166. KLEIN L, LUNSETH PA, AADELEN RJ : Comparison of functional and non-functional tendon grafts. J Bone Jt Surg Am (1972) **54** : 1745-1753
167. KLEINER JB, AMIEL D, ROUX RD, AKESON WH : Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft. J Orthop Res (1986) **4** : 466-474
168. KLEINER JB, AMIEL D, HARWOOD FL, AKESON WH : Early histologic, metabolic, and vascular assessment of anterior cruciate ligament autografts. J Orthop Res (1989) **7** : 235-242
169. KLOS TV, HARMAN MK, HABETS RJ, DEVILEE RJ, BANKS SA : Locating femoral graft placement from lateral radiographs on anterior cruciate ligament reconstruction : a comparison of 3 methods of measuring radiographic images. Arthroscopy (2000) **16** : 499-504
170. KNOX P, CROOKS S, RIMMER CS : Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. J Cell Biol (1986) **102** : 2318-2323
171. KOBAYASHI D, KUROSAKA M, YOSHIYA S, MIZUNO K : The effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in canine anterior cruciate ligament. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (1997) **5** : 189-194
172. KOHN D, BUSCHE T, CARLS J : Drill hole position in endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction. Results of an advanced arthroscopy course. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (1998) **6 (Suppl 1)** : S13-S15
173. KOTTMANN UR, WITZKE G : Untersuchungen zur Abdichtung von Gefäßprothesenoberflächen mit und ohne Zusatz von Faktor-XIII-Konzentrat. Thoraxchir Vask Chir (1978) **26** : 14-19
174. KORNBLATT I, WARREN RF, WICKIEWICZ TL. Long-term followup of anterior cruciate ligament reconstruction using the quadriceps tendon substitution for chronic anterior cruciate ligament insufficiency. Am J Sports Med (1988) **16** : 444-448
175. KÜHN K : Kollagenstoffwechsel. Drug Res (1974) **24** : 225-231
176. KUGELMEIER K : Experimentelle, proliferationskinetische Untersuchungen über die Wirkung des Plasmafaktors XIII auf das Knochen-wachstum in vitro und in vivo. Inauguraldissertation Universität Ulm (1985)

177. KURODA R, KUROSACA M, YOSHIYA S, MIZUNO K : Localization of growth factors in the reconstructed anterior cruciate ligament : immunohistological study in dogs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2000) **8** : 120-126
178. LABS K : Histologische und histomorphometrische Untersuchungen des Einwachsverhaltens einer autogenen Kreuzbandplastik bei differenzierten Vorspannungen – tierexperimentelle Studie. Promotion an der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität Berlin (1993)
179. LABS K, PAUL B : To compare and contrast the various evaluation scoring systems after anterior cruciate ligament reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg* (1997) **116** : 92-96
180. LABS K, PERKA C, SCHNEIDER F : The biological and biomechanical effect of different graft tensioning in anterior cruciate ligament reconstruction : an experimental study. *Arch Orthop Trauma Surg* (2002) **in Druck**
181. LAEMMLI UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227** : 680-685
182. LAKI K, LÓRÁND L : On the solubility of fibrin clots. *Science* (1948) **108** : 280
183. LANDI AP, ALTMAN FP, PRINGLE J : Oxidative enzyme metabolism in rabbit intrasynovial flexor tendons. I. Changes in enzyme activity of the tenocytes with age. *J Surg Res* (1980) **29** : 276-280
184. LANE JG, MCFADDEN P, BOWDEN K, AMIEL D : The ligamentization process : a 4 year case study following ACL reconstruction with a semitendinosis graft. *Arthroscopy* (1993) **9** : 149-153
185. LAPIERE CM, NUSGENS B, PIERARD GE : Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res* (1977) **5** : 21-29
186. LAURENT GJ, COCKERILL P, MCANULTY RJ, HASTINGS JR : A simplified method for quantitation of the relative amounts of type I and type III collagen in small tissue samples. *Anal Biochem* (1981) **113** : 301-312
187. LEE J, GREEN HM, AMIEL D : Synergistic effect of growth factors on cell outgrowth from explants of rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments. *J Orthop Res* (1995) **13** : 435-441
188. LEE J, HARWOOD FL, AKESON WH, AMIEL D : Growth factor expression in healing rabbit medial collateral ligament and anterior cruciate ligament. *Iowa Orthop J* (1998) **18** : 19-25

189. LEMLEY PV, WELCH MJ : A correlation between muscular strength and hydroxyproline concentration in human patellar tendon. *J Sports Med Phys Fitness* (1991) **31** : 104-107
190. LINSSENMAYER TF, GIBNEY E, IGOE F, GORDEN MK, FITCH JM, FESSLER LI, BIRK DE : Type V collagen : molecular structure and fibrillar organization of chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* (1993) **121** : 1181-1189
191. LINTNER DM, DEWITT SE, MOSELEY JB : Radiographic evaluation of native anterior cruciate ligament attachments and graft placement for reconstruction. A cadaveric study. *Am J Sports Med* (1996) **24** : 72-78
192. LISTRAT A, PICARD B, GEAY Y : Age-related changes and location of type I, III and IV collagens during skeletal muscle development of double-muscle and normal bovine foetuses. *J Muscle Res Cell Motil* (1998) **19** : 1-14
193. LIU SH, AL-SHAikh R, PANOSSIAN V, YANG RS, NELSON SD, SOLEIMAN N, FINERMAN GA, LANE JM : Primary immunolocalization of estrogen and progesterone target cells in the human anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* (1996) **14** : 526-533
194. LIU SH, AL-SHAikh, PANOSSIAN V, FINERMAN GA, LANE JM : Estrogen affects the cellular metabolism of the anterior cruciate ligament. A potential explanation for female athletic injury. *Am J Sports Med* (1997) **25** : 704-709
195. LIU SH, PANOSSIAN V, AL-SHAikh R, TOMIN E, SHEPHERD E, FINERMAN GA, LANE JM : Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clin Orthop* (1997) **339** : 253-260
196. LO IK, MARSCHUK LL, HART DA, FRANK CB : Comparison of mRNA levels for matrix molecules in normal and disrupted human anterior cruciate ligaments using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Orthop Res* (1998) **16** : 421-428
197. LÓRÁND L, LOSOWSKY MS, MILOSZEWSKI KJ : Human factor XIII : fibrin-stabilizing factor. *Prog Hemost Thromb* (1980) **5** : 245-290
198. LÓRÁND L : Activation of blood coagulation factor XIII. *Ann NY Acad Sci* (1986) **485** : 144-158
199. LYSHOLM J, GILLQUIST J : Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale. *Am J Sports Med* (1982) **10** : 150-154

200. MACHNER A, PAP G, SCHWARZENBERG H, EBERHARDT R, ROESSNER A, NEUMANN W : Störung sensibler Gelenkinnervation als begünstigender Faktor für die Arthroseentstehung. Eine tierexperimentelle Untersuchung am Rattenmodell. *Z Rheumatol* (1999) **58** : 148-154
201. MALETIUS W, MESSNER K : Eighteen- to twenty-four-year follow-up after complete rupture of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* (1999) **27** : 711-717
202. MANKIN HJ, DORFMANN H, LIPPIELLO L, ZARINS A : Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* (1971) **53** : 523-537
203. MARKTL W, RUDAS B : The effect of factor XIII on wound granulation in the rat. *Thromb Diath Haemorrh* (1974) **32** : 578-581
204. MARDER RA, RASKIND JR, CARROLL M : Prospective evaluation of arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction. Patellar tendon versus semitendinosus and gracilis tendons. *Am J Sports Med* (1991) **19** : 479-484
205. MARUMO K, KUMAGAE Y, TANAKA T, FUJII K : Long-term results of anterior cruciate ligament reconstruction using semitendinosus and gracilis tendons with Kennedy ligament augmentation device compared with patellar tendon autografts. *J Long Term Eff Med Implants* (2000) **10** : 251-265
206. MATTHEW CA, MOORE MJ : Regeneration of rat extensor digitorum longus tendon : the effect of a sequential partial tenotomy on collagen fibril formation. *Matrix* (1991) **11** : 259-268
207. MARUI T, NIYIBIZI C, GEORGESCU HI, CAO M, KAVALKOVICH KW, LEVINE RE, WOO SL : Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J Orthop Res* (1997) **15** : 18-23
208. MCFARLAND EG, MORREY BF, AN KN, WOOD MB : The relationship of vascularity and water content to tensile strength in a patellar tendon replacement of the anterior cruciate in dogs. *Am J Sports Med* (1986) **14** : 436-448
209. MCFARLAND EG : The biology of anterior cruciate ligament reconstructions. *Orthopedics* (1993) **16** : 403-410
210. MENETREY J, KASEMKIJWATTANA C, DAY CS, BOSCH P, FU FH, MORELAND MS, HUARD J : Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng* (1999) **5** : 435-442

211. MENSCHIK A : Mechanik des Kniegelenkes. Teil 1. Z Orthop Ihre Grenzgeb (1974) **113** 481-495
212. MENSCHIK A : Mechanik des Kniegelenkes. Teil 2. Z Orthop Ihre Grenzgeb (1975) **114** 388-400
213. MENSCHIK A : Grundsätzliches zur Kinematik und Selbstverwirklichung der unbekannten biologischen Bewegungssysteme unter besonderer Berücksichtigung des Kniegelenkes. Hefte Unfallheilkd (1984) **167** : 23-47
214. METZNER HJ, DICKNEITE G, DIEHL K-H : Faktor XIII und Wundheilung – präklinische Untersuchungen. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp 111-118
215. MISHIMA Y, NAGAO F, ISHIBIKI K, MATSUDA M, NAKAMURA N : Faktor XIII in der Behandlung postoperativer therapierefraktärer Wundheilungsstörungen. Ergebnisse einer kontrollierten Studie. Chirurg (1984) **55** : 803-808
216. MITSOU A, VALLIANATOS P : Reconstruction of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon autograft. A long term follow up. Int Orthop (1996) **20** : 285-289
217. MIYACHI N, TAKANAHI H, MATSUSHI T : Effect of plasmafactor XIII (BI 71.023) on the growth and the morphological changes of human fibroblasts on plasma clots. Jpn Pharmacol Ther (1993) **21** : 1721-1727
218. MOHR W : PATHOLOGIE DES BANDAPPARATES. In : Doerr-Seifert-Uehlinger, Spezielle pathologische Anatomie, Band 14, pp1-55, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo 1987
219. MOK DW, DOWD GS. Long-term results of anterior cruciate reconstruction with the patellar tendon. Injury (1993) **24** : 385-388
220. MOMMERSTEEG TJ, KAUER JM, HUISKES R, BLANKEVOORT L : Method to determine collagen density distributions in fibrous tissues. J Orthop Res (1993) **11** : 612-616
221. MOMMERSTEEG TJ, BLANKEVOORT L, KOOLOOS JG, HENDRIKS JC, KAUER JM, HUISKES R : Nonuniform distribution of collagen density in human knee ligaments. J Orthop Res (1994) **12** : 238-245
222. MORGAN CD, KALMAM VR, GRAWL DM : Isometry testing for anterior cruciate ligament reconstruction revisited. Arthroscopy (1995) **11** : 647-659

223. MORGAN CD : All-inside ACL reconstruction. Manual, Arthrex Karlsfeld, Deutschland (1995)
224. MOSESSON MW : Fibrinogen and fibrin polymerization : appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly. *Blood Coagul Fibrinolysis* (1998) **8** : 257-267
225. MUNETA T, YAMAMOTO H, TAKAKUDA K, SAKAI H, FURUYA K : Effects of postoperative immobilization on the reconstructed anterior cruciate ligament. An experimental study in rabbits. *Am J Sports Med* (1993) **21** : 305-313
226. MURAKAMI Y, OCHI M, IKUTA Y, HIGASHI Y : Permeation from the synovial fluid as a nutritional pathway for the anterior cruciate ligament in rabbits. *Acta Physiol Scand* (1996) **158** : 181-187
227. MURAO T, OCHI M, JITSUKI J, IKUTA Y : The adverse effects of sectioning the posterior cruciate ligament in rabbits. Changes in the structural and morphological properties of the femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. *Arch Orthop Trauma Surg* (1997) **116** : 1-5
228. MURRAY MM, MARTIN SD, SPECTOR M : Migration of cells from human anterior cruciate ligament explants into collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Orthop Res* (2000) **18** : 557-564
229. MUTO T, ISHIBIKI K, NAKAMURA N, MATSUDA M, SHIRAI Y, OGAWA N : Postoperativer Faktor XIII-Mangel und Wundheilungsstörungen. *Die gelben Hefte* (1997) **37** : 83-87
230. NAGELSCHMIDT M, MOCZULSKI J, RÖDDECKER K : Comparison of different factor XIII preparations in the rat model of gelatin-impaired wound healing. In : *Factor XIII*, Eds. McDonagh M, Seitz R, Egbring R Schattauer, Stuttgart-New York, 1993, pp 272-277
231. NAKAMURA N, HART DA, BOORMAN RS, KANEDA Y, SHRIVE NG, MARCHUK LL, SHINO K, OCHI T, FRANK CB : Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. *J Orthop Res* (2000) **18** : 517-523
232. NATRI A, JÄRVINEN M, LETHO M, KANNUS P : Reconstruction of the chronically insufficient anterior cruciate ligament : long term results of the Eriksson procedure. *Int Orthop* (1996) **20** : 28-31

233. NEAME PJ, KAY CJ, MCQUILLAN DJ, BEALES MP, HASSELL JR : Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell Mol Life Sci* (2000) **57** : 859-863
234. NEIDEL J, SCHROERS B, SINTERMANN F : The effects of high-dose methotrexate on the development of cartilage lesions in a lapine model of osteoarthritis. *Arch Orthop Trauma Surg* (1998) **117** : 265-269
235. NEIL AC, LAURENCE ED : The effect of growth factors on the healing of ligaments. *Trans Orthop Res Soc* (1993) **39** : 60
236. NEURATH M, STOFFT E : Unterschiede im Erhaltungszustand zwischen vorderem und hinterem Kreuzband bei rheumatoider Arthritis. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* (1991) **129** : 480-487
237. NEURATH M, STOFFT E : Fascicular and sub-fascicular architecture of the cruciate ligament. *Unfallchirurgie* (1992a) **18** : 125-132
238. NEURATH M, STOFFT E : Structure and function of matrix components in the cruciate ligaments. An immunohistochemical, electron-microscopic, and immunoelectron-microscopic study. *Acta Anat Basel* (1992b) **145** : 387-394
239. NEWTON PO, WOO SL, MACKENNA DA, AKESON WH : Immobilization of the knee joint alters the mechanical and ultrastructural properties of the rabbit anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* (1995) **13** : 191-200
240. NG GY, OAKES BW, DEACON OW, MCLEAN ID, EYRE DR : Long-term study of the biochemistry and biomechanics of anterior cruciate ligament-patellar tendon autografts in goats. *J Orthop Res* (1996) **14** : 851-856
241. NIYIBIZI C, EYRE DR : Structural analysis of extension peptides on the matrix forms of type V collagen in fetal calf bone and skin. *Biochem Biophys Acta* (1993) **1203** : 304-309
242. NIYIBIZI C, KAVALKOVICH K, YAMAJI T, WOO SL : Type V collagen is increased during rabbit medial ligament healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2000) **8** : 281-285
243. NORTHMORE-BALL MD, DANDY DJ, JACKSON RW : Arthroscopic, open partial, and total meniscectomy. A comparative study. *J Bone Joint Surg Br* (1983) **65** : 400-404
244. NOYES FR, DELUCAS JL, TORVIK PJ : Biomechanics of anterior cruciate ligament failure : an analysis of strain-rate sensitivity and mechanisms of failure in primates. *J Bone Joint Surg Am* (1974) **56** : 236-253

245. NOYES FR, BARBER-WESTIN SD : Reconstruction of the anterior cruciate ligament with human allograft. Comparison of early and later results. J Bone Joint Surg Am (1996) **78** : 524-537
246. OAKES BW, PARKER AW, NORMAN J : Change in collagen fiber populations in young rat cruciate ligaments in response to an one month intensive exercise program. Connect Tissue Res (1982) **9** : 212 (Abstract)
247. OAKES BW : Collagen ultrastructure in the normal ACL and ACL graft. In Jackson DW (Ed) . The anterior cruciate ligament : Current and future concepts. Raven Press New York, 1993, pp 209-217
248. O'DRISCOLL SW, COMMISSO CN, FITZSIMMONS JS : Type II collagen quantification in experimental chondrogenesis. Osteoarthritis Cartilage (1995) **3** : 197-203
249. O'NEILL DB : Arthroscopically assisted reconstruction of the anterior cruciate ligament. A follow-up report. J Bone Joint Surg Am (2001) **83** : 1329-1332
250. OSTERMANN H : Biochemie und Funktion des Faktor XIII. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp 1-6
251. PANNI AS, MILANO G, LUCANIA L, FABBRICIANI C : Graft healing after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits. Clin Orthop (1997) **343** : 203-212
252. PANOSSIAN V, LIU SH, LANE JM, FINERMAN GA : Fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in ligament healing. Clin Orthop (1997) **342** : 173-180
253. PAP G, EBERHARDT R, STÜRMER I, MACHNER A, SCHWARZBERG H, ROESSNER A, NEUMANN W : Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. Pathol Res Pract (1998) **194** : 41-47
254. PAPACHRISTOU G, TILENTZOGLU A, EFSTATHOPOULOS N, KHALDI L : Reconstruction of anterior cruciate ligament using the doubled tendon graft technique : an experimental study in rabbits. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (1998) **6** : 246-252
255. PARRY DA, BARNES GR, CRAIG AS : A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. Proc R Soc Lond B Biol Sci (1978) **203** : 305-321

256. PARRY DA, CRAIG AS : Growth and development of collagen fibrils in connective tissue. In : Ruggeri A, Motta PM (Eds) : *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. Boston, Martinus Nijhoff Publisher, 1984, pp 33-64
257. PATEL JV, CHURCH JS, HALL AJ : Central third bone-patellar tendon-bone anterior cruciate ligament reconstruction : a 5-year follow-up. *Arthroscopy* (2000) **16** : 67-70
258. PAUL JS, KITABAYASHI LR, AMIEL D, AKESON WH, WOODS VL : Integrin display increases in the wounded rabbit medial collateral ligament but not the wounded anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* (1995) **13** : 174-183
259. PAYÉ M, LAPIÈRE CM : Wundheilung : Der Beitrag des Gerinnungsfaktors XIII. *Die gelben Hefte* (1986) **26** : 128-135
260. PETERSEN W, LAPRELL H : Insertion of autologous tendon grafts to the bone : a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2000) **8** : 26-31
261. PETERSEN W, TILLMANN B : Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)*. (1999) **200** : 325-334
262. PETERSON RK, SHELTON WR, BOMBOY AL. Allograft versus autograft patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction : A 5-year follow-up. *Arthroscopy* (2001) **17** : 9-13
263. PIERCE GF, MUSTOE TA, ALTROCK BW, DEUEL DF, THOMASON A : Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* (1991) **45** : 319-326
264. PLAAS AH, WONG-PALMS S, KOOB T, HERNANDEZ D, MARCHUK L, FRANK CB : Proteoglycan metabolism during repair of the ruptured medial collateral ligament in skeletally mature rabbits. *Arch Biochem Biophys* (2000) **374** : 35-41
265. PLANCHER KD, STEADMAN J, BRIGGS KK, HUTTON KS : Reconstruction of the anterior cruciate ligament in patients who are at least forty years old. A long term follow-up and outcome study *J Bone Joint Surg Am* (1998) **80** : 184-197
266. POKAR S, WIßMEYER T, KRISCHAK G, KIEFER H, KINZL L, HEHL G : Die arthroskopisch gestützte Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels autologer Patellarsehnenersatzplastik. *Unfallchirurg* (2001) **104** : 317-324
267. POVACZ P, BREITFUß H, FRÖHLICH R, RESCH H : Veränderungen im Femoropatellargelenk durch Entnahme des mittleren Patellarsehnen-drittels bei vorderer Kreuzbandplastik. *Arthroskopie* (1997) **10** : 110-115

268. POSTACCHINI F, ACCINNI L, NATALI PG, IPPOLITO E, DEMARTINO C : Regeneration of rabbit calcaneal tendon : a morphological and immunochemical study. *Cell Tissue Res* (1978) **195** : 81-97
269. PRATT DA, DANILOFF Y, DUNCAN A, ROBINS SP : Automated analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in tissue and urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* (1992) **207** : 168-175
270. REDDY GK, ENWEMEKA CS : A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* (1996) **29** : 225-229
271. REICHENBERGER J, NEU B, NADER M, MÖßNER G, SCHWEIGERT U : Faktor XIII bei Sepsis-assoziierten Hautläsionen. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung.* Basel, Karger, 1999, pp 93-97
272. RENNARD SI, BERG R, MARTIN GR, FOIDART JM, ROBEY PG : Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal Biochem* (1980) **104** : 205-214
273. RENZONI SA, AMIEL D, HARWOOD FL, AKESON WH : Synovial nutrition of the knee ligaments. *Trans Orthop Res Soc* (1984) **9** : 277
274. REST VAN DER M, GARRONE R : Collagen family of proteins. *FASEB J* **5** (1991) 2814-2823
275. RIECHERT K : Quantitative Analysen biochemischer Parameter von Bändern des Kniegelenkes und ausgewählten Sehnen am Kaninchenmodell. Promotion an der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin (2001)
276. RIESLE J, HOLLANDER AP, LANGER R, FREED LE, VUNJAK-NOVAKOVIC G : Collagen in tissue-engineered cartilage : types, structure, and crosslinks. *J Cell Biochem* (1998) **71** : 313-327
277. ROBERTS AB, SPORN MB : Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TFG-beta). *Growth factors* (1993) **8** : 1-9
278. ROBERTS TS, DREZ D JR, MCCARTHY W, PAINE R : Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med* (1991) **19** : 35-41

279. ROBINS SP, BAILEY AJ : The chemistry of the collagen cross-links. Characterization of the products of reduction of skin, tendon and bone with sodium cyanoborohydride. *Biochem J* (1977) **163** : 339-346
280. ROBINS SP : An enzyme-linked immunoassay for the collagen cross-link pyridinoline. *Biochem J* (1982) **207** : 617-620
281. ROCKBORN P, GILLQUIST J : Outcome of arthroscopic meniscectomy. A 13-year physical and radiographic follow-up of 43 patients under 23 years of age. *Acta Orthop Scand* (1995) **66** : 113-117
282. ROCKBORN P, MESSNER K : Long-term results of meniscus repair and meniscectomy : a 13-year functional and radiographic follow-up study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2000) **8** : 2-10
283. RODEO SA, ARNOCZKY SP, TORZILLI PA, HIDAKA C, WARREN R : Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am* (1993) **75** : 1795-1803
284. RODEO SA, SUZUKI K, DENG XH, WOZNEY J, WARREN RF : Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* (1999) **27** : 476-488
285. ROOS EM, OSTENBERG A, ROOS H, EKDAHL C, LOHMANDER LS : Long-term outcome of meniscectomy : symptoms, function and performance tests in patients with or without radiographic osteoarthritis compared to matched controls. *Osteoarthritis Cartilage* (2001) **9** : 316-324
286. RUBINSTEIN RA JR, SHELBOURNE KD, VANMETER CD, MCCARROLL JC, RETTIG AC : Isolated autogenous bone-patellar tendon-bone graft site morbidity. *Am J Sports Med* (1994) **22** : 324-327
287. RUGGERI A, BENAZZO F : Collagen-proteoglycan interaction. In : Ruggeri A, Motta PM (Eds) : *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. Boston, Martinus Nijhoff Publisher, 1984, pp 113-125
288. SACHS RA, DANIEL DM, STONE ML, GARFEIN RF : Patellofemoral problems after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* (1989) **17** : 760-765
289. SAKAI H, FUKUI N, KAWAKAMI A, KUROSAWA H : Biological fixation of the graft within bone after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits : effects of the duration of postoperative immobilization. *J Orthop Sci* (2000) **5** : 43-51
290. SANDBERG R, BALKFORS B : Reconstruction of the anterior cruciate ligament. A 5-year follow-up of 89 patients. *Acta Orthop Scand* (1988) **59** : 288-293

291. SAPEGA AA, MOYER RA, SCHNECK C, KOMALAHIRANYA N : Testing for isometry during reconstruction of the anterior cruciate ligament. Anatomical and biomechanical considerations. *J Bone Joint Surg Am* (1990) **72** : 259-267
292. SCAVENIUS M, BAK K, HANSEN S, NORRING K, JENSEN KH, JORGENSEN U : Isolated total ruptures of anterior cruciate ligament-a clinical study with long-term follow-up of 7 years. *Scand J Med Sci Sports* (1999) **9** : 114-119
293. SCHERPING SC JR, SCHMIDT CC, GEORGESCU HI, KWOH CK, EVANS CH, WOO SL : Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. *Connect Tissue Res* (1997) **36** : 1-8
294. SCHIAVONE PANNI A, FABBRICIANI C, DELCOGLIANO A, FANZESE S : Bone-ligament interaction in patellar tendon reconstruction of the ACL. *Knee Surgery Sports Traumatol Arthrosc* (1993) **1** : 4-8
295. SCHLENZKA R, V GARREL T, PISTOR C : Does Fibrogammin significantly accelerate bone healing? *J Bone Joint Surg Br* (1993) **75-B, Suppl II** : 100
296. SCHMIDT G, ROBENEK H, HARRACH B, GLOSSL J, NOLTE V, HORMANN H, RICHTER H, KRESSE H : Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin. *J Cell Biol* (1987) **104** : 1683-1691
297. SCHMIDT CC, GEORGESCU HI, KWOH CK, BLOMSTROM GL, ENGLE CP, LARKIN LA, EVANS CH, WOO SL : Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J Orthop Res* (1995) **13** : 184-190
298. SCHMIDTLER F, SCHILDBERG FW, SCHRAMM W, GLEISNER C : Zur Pathogenese der postoperativen Bauchwandruptur Teil I. *Münch Med Wochenschr* (1977) **119** : 685-689
299. SCHRAMM W, SCHAARSCHMIDT K, SCHMIDTLER F, SCHILDBERG FW : Zur Pathogenese der postoperativen Bauchwandruptur Teil II. *Münch Med Wochenschr* (1977) **119** : 690-697
300. SCHWAB R, CLAES L, GERNGROß H : Faktor XIII und Knochenbruchheilung – experimentelle und klinische Daten. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung.* Basel, Karger, 1999, pp 166-172
301. SCIORE P, BOYKIW R, HART DA : Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor

receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. J Orthop Res (1998) **16** : 429-437

302. SCUDERI GR : The femoral intercondylar roof angle : radiographic and MRI measurement. Am J Knee Surg (1993) **6** : 10-14

303. SCOTT PG, VEIS A : The cyanogen bromide peptides of bovine soluble and insoluble collagens. I. Characterization of peptides from soluble type I collagen by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Connect Tissue Res (1976) **4** : 107-116

304. SCOTT PG, TELSER AG, VEIS A : Semiquantitative determination of cyanogen bromide peptides of collagen in SDS-polyacrylamide gels. Anal Biochem (1976) **70** : 251-257

305. SCOTT JE, ORFORD CR, HUGHES EW : Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation. Biochem J (1981) **195** : 573-581

306. SCRANTON PE JR, LANZER WL, FERGUSON MS, KIRKMAN TR, PFLASTER DS : Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. Arthroscopy (1998) **14** : 702-716

307. SEIBEL MJ, ZIPF A, ZIEGLER R : Pyridinium-Crosslinks im Urin. Dtsch Med Wochenschr (1994) **119** : 923-929

308. SEIFFERT KE : Biologische Grundlagen der homologen Transplantation konservierter Bindegewebe. Klinische Anwendung konservierter homologer Sehnentransplantate in der Handchirurgie. Hefte Unfallheilkd (1967) **93** : 1-144

309. SEIL R, MÜLLER B, GEORG T, KOHN D, RUPP S : Reliability and interobserver variability in radiological patellar height ratios. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2000) **8** : 231-236

310. SEITZ H, CHRYSOPOULOS A, EGKHER E, MOUSAVI M : Long term results of replacement of the anterior cruciate ligament in comparison with conservative therapy. Chirurg (1994) **65** : 992-998

311. SHAFFER BS, TIBONE JE : Patellar tendon length change after anteior cruciate ligament reconstruction using midthird patellar tendon. Am J Sports Med (1993) **21** : 449-454

312. SHELBOURNE KD, NITZ P : Accelerated rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med (1990) **18** : 292-299

313. SHELBOURNE KD, STUBE KC. Anterior cruciate ligament (ACL -deficient knee with degenerative arthrosis : treatment with an isolated autogenous patellar tendon ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1997) **5** : 150-156
314. SHOEMAKER SC, RECHL H, CAMPBELL P, KRAM HB, SANCHEZ M : Effects of fibrin sealant on incorporation of autograft and xenograft tendons within bone tunnels. A preliminary study. *Am J Sports Med* (1989) **17** : 318-324
315. SILBERZAHN J : Factor XIII and impaired wound healing – possibilities of F XIII application in ENT. In : Factor XIII, Eds. McDonagh M, Seitz R, Egbring R, Schattauer, Stuttgart-New York, 1993, pp 266-270
316. SIMPSON DA, THOMAS NP, AICHROTH PM : Open and closed meniscectomy. A comparative analysis. *J Bone Joint Surg Br* (1986) **68** : 301-304
317. SOMER L, VUKADINOVIC S, SOMER T, MIKIC Z, MILANKOV M : Histologic changes in fascia lata transplants in the replacement of the anterior cruciate ligament of the knee in dogs. *Acta Chir Yugosl* (1990) **37** : 51-55, Suppl 1
318. SOMMER C, FRIEDERICH NF, MÜLLER W : Improperly placed anterior cruciate ligament grafts : correlation between radiological parameters and clinical results. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2000) **8** : 207-213
319. SOMMERLATH K, LYSHOLM J, GILLQUIST J : The long-term course after treatment of acute anterior cruciate ligament ruptures. A 9 to 16 year followup. *Am J Sports Med* (1991) **19** : 156-162
320. SPINDLER KP, IMRO AK, MAYES CE, DAVIDSON JM : Patellar tendon and anterior cruciate ligament have different mitogenic responses to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *J Orthop Res* (1996) **14** : 542-546
321. STÄUBLI HU, RAUSCHNING W : Tibial attachment area of the anterior cruciate ligament in the extended knee position. Anatomy and cryosections in vitro complemented by magnetic resonance arthrography in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (1994) **2** : 138-146
322. STEGEMANN H, STALDER K : Determination of hydroxyproline. *Clin Chem Acta* (1967) **18** : 267-273
323. STEINMANN B, GITZELMANN R : Das Kollagen im Bindegewebe : Vom Leim zur Molekularstruktur. *Orthopäde* (1984) **13** : 3-8
324. SVOBODA EL, HOWLEY TP, DEPORTER DA : Collagen fibril diameter and its relation to collagen turnover in three soft connective tissues in the rat *Connect Tissue Res* (1983) **12** : 43-48

325. SYKES B, PUDDLE B, FRANCIS M, SMITH R : The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* (1976) **72** : 1472-1480
326. TAKAHASHI T, CHO HI, KUBLIN CL, CINTRON C : Keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans associate with type VI collagen in fetal rabbit cornea. *J Histochem Cytochem* (1993) **41** : 1447-1457
327. TAKAHASHI M, HOSHINO H, KUSHIDA K, INOUE T : Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* (1995) **232** : 158-162
328. TANZER ML : Cross-linking of collagen. *Science* (1973) **180** : 561-566
329. TAPPER EM, HOOVER NW : Late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* (1969) **51** : 517-526
330. TAUBER R, SEIDEL W, SCHAFER R : Tierexperimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Faktor XIII auf die Reißfestigkeit von Kanninchenfaszien. *Arzneimittelforschung* (1974) **24** : 1557-1559
331. TEGNER Y, LYSHOLM J : Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries *Clin Orthop* (1985) **198** : 43-49
332. TROBISCH H, BRANDT KA : Faktor-XIII-Mangel bei akuten Verbrennungen In : *Gerinnungsfaktor XIII* (Ed) Brückner WL, Urban-Schwarzenberg, 1983, pp 93-94
333. TZAPHLIDOU M : Diameter distributions of collagenous tissues in relation to sex. A quantitative ultrastructural study. *Micron* (2001) **32** : 333-336
334. UEKI S, TAKAGI J, SAITO Y : Dual functions of transglutaminase in novel cell adhesion. *J Cell Sci* (1996) **109** : 2727-2735
335. VOGEL KG, PAULSSON M, HEINEGARD D : Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* (1984) **223** : 587-597
336. WALKER PS, ERKMAN MJ : The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop* (1975) **109** : 184-192
337. WASSILEW G : Morphometrie der Mitochondrien. Inauguraldissertation der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin (1977)

338. WATANABE N, TAKAI S, MORITA N, KAWATA T, HIRASAWA Y : New method of distinguishing between intrinsic cells in situ and extrinsic cells supplied by the autogenic transplantation, employing transgenic rats. *Trans Orthop Res Soc* (1998) **23** : 1035
339. WEIBEL ER, ELIAS H : Quantitative methods in morphology. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967 pp 1-114
340. WILLIAMS IF, MCCULLAGH KG, SILVER IA : The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* (1984) **12** : 211-227
341. WILLIAMS IF, CRAIG AS, PARRY DA : Development of collagen fibril organization and collagen crimp pattern during tendon healing. *Int J Biol Macromol* (1985) **31** : 275-282
342. WIGGINS ME, FADALE PD, BARRACH H, EHRLICH MG, WALSH WR : Healing characteristics of a type I collagenous structure treated with corticosteroids. *Am J Sports Med* (1994) **22** : 279-288
343. Wissenschaftliche Tabellen (1982) Geigy; 8. Aufl. Basel
344. WITTENBERG RH, OXFORD HU, PLAFKI C : A comparison of conservative and delayed surgical treatment of anterior cruciate ligament ruptures. A matched pair analysis. *Int Orthop* (1998) **22** : 145-148
345. WOO SL, HOLLIS JM, ROUX RD, GOMEZ MA, INOUE M, KLEINER JB, AKESON WH : Effects of knee flexion on the structural properties of the rabbit femur-anterior cruciate ligament-tibia complex (FATC). *J Biomech* (1987) **20** : 557-563
346. WOO, SL, NIYIBIZI C, MATYAS J, KAVALKOVICH K, WEAVER-GREEN C, FOX RJ : Medial collateral knee ligament healing. Combined medial collateral and anterior cruciate ligament injuries studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* (1997) **68** : 142-148
347. WOO SL, HILDEBRAND K, WATANABE N, FENWICK JA, PAPAGEORGIOU CD, WANG JH : Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop* (1999) **367S** : S312-323
348. WOZNIAK G, NOLL T, HEHRLEIN FW : Einfluß von Faktor XIII auf die endotheliale Barriere - Klinik und Experiment. In : Egbring R, Seitz R, Wozniak G (Hrsg) : Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung. Basel, Karger, 1999, pp 16-25

349. WOZNIAK G, LUTZ H, NOLL T, ALEMANY J : Behandlung stark sekretierender, chronischer Wunden mit Faktor XIII. III Klinische Modalitäten und Ergebnisse Zeitschrift für Wundheilung (2001) **20** : 11-14
350. YAHIA LH, DROUIN G : Microscopical investigation of canine anterior cruciate ligament and patellar tendon : collagen fascicle morphology and architecture. J Orthop Res (1989) **7** : 243-251
351. YAMAKAGE A, UCHIYAMA Y, NIHEI Y, ISHIKAWA H : Glycosaminoglycan alteration in the skin of children with classical Ehlers-Danlos syndrome. Acta Derm Venereol (1985) **65** : 489-494
352. YOSHIYA S, ANDRICH JT, MANLEY MT, BAUER TW : Graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction. An in vivo study in dogs. Am J Sports Med (1987) **15** : 464-470
353. YOSHIYA S, NAGANO M, KUROSAKA M, MURATSU H, MIZUNO K : Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction. Clin Orthop (2000) **376** : 278-286
354. YOUNG RG, BUTLER DL, WEBER W, CAPLAN AI, GORDON SL, FINK DJ : Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. J Orthop Res (1998) **16** : 406-413
355. YU WD, LIU SH, HATCH JD, PANOSSIAN V, FINERMANN GA : Effect of estrogen on cellular metabolism of the human anterior cruciate ligament. Clin Orthop (1999) **366** : 229-238
356. ZEICHEN J, VAN GRIENSVEN M, SKUTEK M, BOSCH U : Einfluß von zyklischer mechanischer Dehnung auf die Zellproliferation humaner Fibroblasten. Arthroskopie (1999) **12** : 289-293
357. ZYSK SP, REFIOR HJ : Operative or conservative treatment of the acutely torn anterior cruciate ligament in middle-aged patients. A follow-up study of 133 patients between the ages of 40 and 59 years. Arch Orthop Trauma Surg (2000) **120** : 59-64

11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer, Herrn **Prof. Dr. med. habil. Hartmut Zippel**, Direktor der Orthopädischen Universitätsklinik der Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Charité Mitte, für seine wohlwollende kritische Begleitung und Unterstützung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn **Dr. rer. nat. Klaus Lindenhayn** für seine Beratung, Unterstützung und Durchführung der biochemischen Analysen und exzellenten Mitbetreuung der Doktoranden.

Herrn **PD Dr. med. Pranav Sinah** danke ich für die konstruktiven Ideen bei der Durchführung der Kollagentypisierung.

Frau **Dr. rer. nat. Bärbel Brux** danke ich für die Analyse der Querverbindungen.

Frau **Dr. med. Sabine Ziemer** danke ich für die biochemischen Analysen des Faktor XIII.

Herrn **Dr. Andreas Weiler** danke ich für die Beratung und Durchführung der biomechanischen Untersuchungen im Forschungslabor der Unfallchirurgischen Klinik, Campus Virchow Klinikum.

Herrn **Dr. med. Georgi Wassilew** danke ich für die Mitbefundung der histologischen Präparate und der Bereitstellung des von ihm entwickelten Morphometrieprogrammes.

Herrn **Dr. med. vet. Ralfs Joffe** danke ich für die veterenärmedizinische Betreuung und der Ermöglichung, die Tierexperimente im Pharmakologischen Institut GRINDEX durchführen zu können.

Frau **Dr. rer. nat. Angelika Küchler** danke ich für die Beratung der statistischen Auswertungen.

Frau **Melanie Tobler** danke ich für die Anfertigung der licht- und elektronenmikroskopischen Präparate.

Mein Dank ist an die Doktoranden **Katrin Riechert, Sven Handke, Thomas Nagel und Sebastian Heinicke** gerichtet, die mit ihren Ideen und Aktivitäten einen Beitrag für die Realisierung dieser Untersuchungen leisteten.

Mein Dank gilt meiner Sekretärin **Frau Marina Müller** für ihre kompetente Mitarbeit.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Universitären Forschungsförderung der Humboldt-Universität zu Berlin und der Firma Aventis (ehemals Centeon).

Ich danke meiner Familie für die Geduld und Akzeptanz, die zum Gelingen dieser Arbeit führten.

Berlin, Dezember 2001

Dr. med. Karsten Labs

13. Anhang

13. 1 Abkürzungsverzeichnis

bFGF – basic fibroblast growth factor
BMP-2 – bone morphogenic protein-2
CNBr – Cyanobromid
DPD – Deoxypyridinolin
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
et al. – und andere
H&E – Hämatoxylin/Eosin
HPLC – high-performance liquid chromatography
HYP – Hydroxyprolin
IKDC – International Knee Documentation Committee
KM – Körpermasse
Koll. – Kollagen
Lig. – Ligamentum
NU – Nachuntersuchung
Pat. – Patienten
PDGF – platelet driven growth factor
pH – pondos hydrogenium
p.o. – post operativ
PS – Patellarsehne
Pyr – Pyridinolin
RIST – Radioimmunsorbent
RNA – ribonuclein acid
SB – Seitenband
SDS – sodium dedecyl sulfate
STT – Semitendinosus tendon
TG – Trockengewicht
TGF- β 1 – transforming growth factor-beta 1
VAS – visuelle analog Skala
VKB – vordere Kreuzband

13. 2 IKDC - Evaluationsblatt

THE IKDC KNEE LIGAMENT STANDARD EVALUATION FORM*[1]									
Name: _____ first name: _____ DOB: ____/____/____ med. rec. #: _____									
Examiner: _____ date of examination: ____/____/____ date of injury/ies: ____/____/____ ; ____/____/____ date of surgeries: ____/____/____ ; ____/____/____									
Cause of injury : <input type="checkbox"/> ADL*[2] <input type="checkbox"/> traff. <input type="checkbox"/> non-pivoting non-contact sports <input type="checkbox"/> pivoting non-contact sp. <input type="checkbox"/> contact sp. <input type="checkbox"/> work									
Time inj. to surg. : _____ (months) <input type="checkbox"/> acute (0-2 weeks) <input type="checkbox"/> subacute (2-8 weeks) <input type="checkbox"/> chronic (>8 weeks)									
Knee involved : <input type="checkbox"/> r. <input type="checkbox"/> l. opposite knee: <input type="checkbox"/> norm. <input type="checkbox"/> injured exam. under anesthes.: <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no									
Postop. diagnosis : _____									
Surgical proced. : _____									
Status menisci : norm <input type="checkbox"/> med. <input type="checkbox"/> lat. 1/3 removed: <input type="checkbox"/> med. <input type="checkbox"/> lat. 2/3 removed: <input type="checkbox"/> med. <input type="checkbox"/> lat. compl. rem. <input type="checkbox"/> med. <input type="checkbox"/> lat.									
Morphotype : <input type="checkbox"/> lax <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> tight <input type="checkbox"/> varus <input type="checkbox"/> valgus									
Activ. level*[3] : preinjury: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV pretreatment: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV									
present: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV Eventual change knee-related: <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no									
GROUPS (PROBLEM AREA)		QUALIFICATION WITHIN GROUPS*[4]				GROUP QUALIFIC.			
		A: normal B: nearly norm. C: abnormal D: sev. abnorm.				A B C D*[4]			
1. PATIENT SUBJECTIVE ASSESSMENT									
How does your knee function?		<input type="checkbox"/> normally <input type="checkbox"/> nearly norm. <input type="checkbox"/> abnormally <input type="checkbox"/> sev. abnorm.							
On a scale of 0 to 3 how does your knee affect your activity level?		<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3				<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
2. SYMPTOMS (absence of significant symptoms, at highest activity level known by patient)*[5]									
No pain at activity level*[3]		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV or worse							
No swelling at activity level*[3]		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV or worse							
No partial giving way at activity level*[3]		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV or worse							
No complete giving way at activity level*[3]		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV or worse				<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
3. RANGE OF MOTION: Flex./ext.: documented side: ____/____ opposite side: ____/____*[6]									
Lack of extension (from zero anatomic)		<input type="checkbox"/> <3° <input type="checkbox"/> 3-5° <input type="checkbox"/> 6-10° <input type="checkbox"/> >10°							
Δ*[7] lack of flexion		<input type="checkbox"/> 0-5° <input type="checkbox"/> 6-15° <input type="checkbox"/> 16-25° <input type="checkbox"/> >25°				<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
4. LIGAMENT EXAMINATION*[8]									
Δ*[7] Lachman (in 25° flex.)*[9]		<input type="checkbox"/> -1 to 2mm <input type="checkbox"/> -1 to -3mm[10] <input type="checkbox"/> or <-3mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Idem (alternative measurement, optional)		<input type="checkbox"/> -1 to 2mm <input type="checkbox"/> 3-5/-1 to -3mm <input type="checkbox"/> 6-10/<-3mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Endpoint: <input type="checkbox"/> firm <input type="checkbox"/> soft									
Δ*[7] total a.p. transl. in 70° flex.*[9]		<input type="checkbox"/> 0 to 2mm <input type="checkbox"/> 3 to 5mm <input type="checkbox"/> 6 to 10mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Idem (alternative measurement, optional)		<input type="checkbox"/> 0 to 2mm <input type="checkbox"/> 3 to 5mm <input type="checkbox"/> 6 to 10mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Δ*[7] post. sag in 70° flex.		<input type="checkbox"/> 0 to 2mm <input type="checkbox"/> 3 to 5mm <input type="checkbox"/> 6 to 10mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Δ*[7] med. joint opening (valgus rotation)		<input type="checkbox"/> 0 to 2mm <input type="checkbox"/> 3 to 5mm <input type="checkbox"/> 6 to 10mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Δ*[7] lat. joint opening (varus rotation)		<input type="checkbox"/> 0 to 2mm <input type="checkbox"/> 3 to 5mm <input type="checkbox"/> 6 to 10mm <input type="checkbox"/> >10mm							
Pivot shift*[11]		<input type="checkbox"/> neg. <input type="checkbox"/> + (glide) <input type="checkbox"/> ++ (clunk) <input type="checkbox"/> +++ (gross)							
Δ*[7] reversed pivot shift		<input type="checkbox"/> equal(neg.) <input type="checkbox"/> slight <input type="checkbox"/> marked <input type="checkbox"/> gross				<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
5. COMPARTMENTAL FINDINGS*[12]									
Δ*[7] Crepitus patellofemoral		<input type="checkbox"/> none/equal <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> painful <input type="checkbox"/> severe							
Δ*[7] Crepitus medial compartment		<input type="checkbox"/> none <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> painful <input type="checkbox"/> severe							
Δ*[7] Crepitus lateral compartment		<input type="checkbox"/> none <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> painful <input type="checkbox"/> severe							
6. HARVEST SITE PATHOLOGY*[13]									
Tenderness, Irritation, numbness		<input type="checkbox"/> none <input type="checkbox"/> slight <input type="checkbox"/> moderate <input type="checkbox"/> severe							
7. X-RAY FINDINGS (DEGENERATIVE JOINT DISEASE)*[14]									
Patellofemoral cartilage space		<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> > 4mm <input type="checkbox"/> 2-4mm <input type="checkbox"/> < 2mm							
Medial compartment cartilage space		<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> > 4mm <input type="checkbox"/> 2-4mm <input type="checkbox"/> < 2mm							
Lateral compartment cartilage space		<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> > 4mm <input type="checkbox"/> 2-4mm <input type="checkbox"/> < 2mm							
8. FUNCTIONAL TEST*[15]									
Δ One leg hop (percent of opposite side)		<input type="checkbox"/> 90-100% <input type="checkbox"/> 76-90% <input type="checkbox"/> 50-75% <input type="checkbox"/> <50%							
FINAL EVALUATION									
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>									

13. 3 Tierversuchgenehmigung

Republik of Latvia

**FOOD AND VETERINARY SERVICE
STATE VETERINARI MEDICINE DIAGNOSTIC CENTRE**

3 Lejupes str., Riga, LV – 1076, LATVIA

Phone: +371 7620526, Fax: +371 7620434, E-mail: vvdc@vvdc.lv

10.12.2001 Nr. 1-13/605Dr. med. Karsten Labs
Oberarzt

I confirm that Dr. med. Karsten Labs worked in the Institute of Pharmacology at company "Grindex" from 01.09.1996. - 20.10.1997.

He was received a protocol of the Institute of Pharmacology for making tests according to European Council directive 86/609/EEC of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes of no. L 358, 18.12.1986 p.1.

Director

R. Joffe